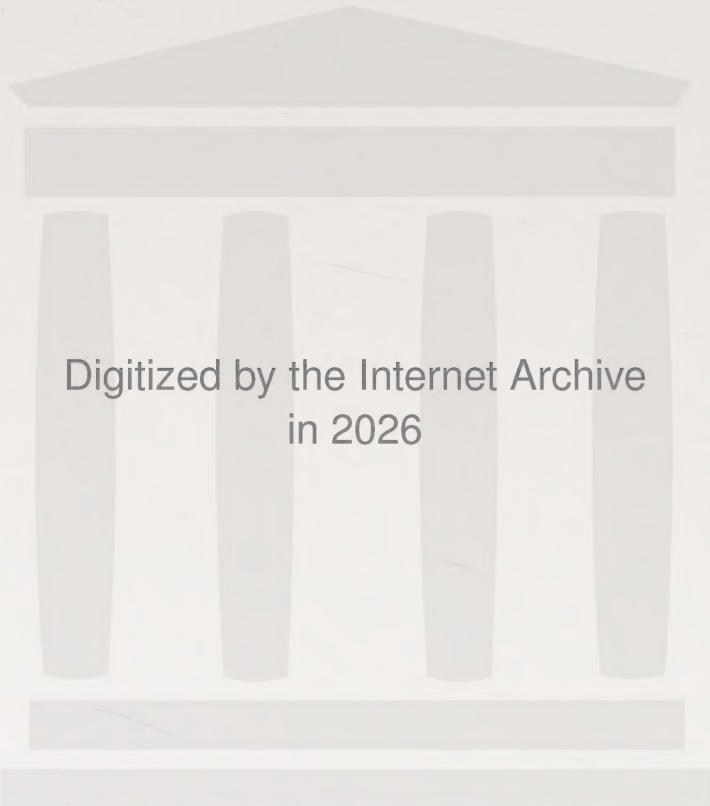


**Beiträge zur Strukturaufklärung polyphenolischer und
O-glykosidischer Pflanzeninhaltsstoffe durch
Massenspektrometrie und GC-MS-Analytik**

Otto Seligmann

1977



Digitized by the Internet Archive
in 2026

DISSERTATIONS— UND FOTODRUCK FRANK oHG
8 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2 8 0 9 0 9 0

Beiträge zur Strukturaufklärung polyphenolischer
und O-glykosidischer Pflanzeninhaltsstoffe durch
Massenspektrometrie und GC-MS-Analytik

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
des
Fachbereichs Chemie und Pharmazie
der
Ludwig-Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt
von
Otto Seligmann
aus
Hohenschäftlarn

Mai 1977



1. Berichterstatter: Professor Dr. H. W a g n e r

2. Berichterstatter: Professor Dr. F. E i d e n

Tag der mündlichen Prüfung: 22.7.1977

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	Seite
EINLEITUNG	1
ALLGEMEINER TEIL	2
I. <u>MS von Flavonoid-O-glykosiden</u>	2
1.0 Bisherige Arbeiten	2
2.0 Eigene Arbeiten über Permethylläther	3
2.1 PM-Flavonol-monoside	6
2.2 PM-Flavonol-bioside und -trioside	14
2.3 PM-Flavonol-diglykoside	17
2.4 PM-Flavon-monoside	23
2.5 PM-Flavon-bioside und -diglykoside	23
2.6 PM-Flavanon-monoside, -bioside und -bisglykoside	26
2.7 PM-Isoflavon-monoside und -bioside	29
2.8 PM-Flavonoid-acylglykoside	31
3. Peracetate	34
4. Pertrimethylsilyläther	50
II. <u>MS von Anthocyaninen</u>	54
III. <u>MS von Cumarin-O-glykosiden</u>	59
IV. <u>MS von Xanthon-O-glykosiden</u>	61
V. <u>MS von Anthrachinon-O-glykosiden</u>	63
VI. <u>GC-MS-Zuckerbestimmung in Polyphenolglykosiden durch</u> <u>Methylierungsanalyse</u>	69
1. Alditolacetate	72
2. Methylaldoxime	76
3. Phenylglykoside	81
4. Anilide	85
VII. <u>Strukturanalyse von Flavonoid-aglyka durch GC-MS</u> <u>ihrer Abbauprodukte</u>	92
1. Alkali-Abbau mit verd.Laugen	92
2. Reduktiver Alkaliabbau	105
3. Oxidativer Alkaliabbau	108
VIII. <u>Neue Inhaltsstoffe aus den Blüten von Melaleuca</u> <u>quinquenervia</u>	109
1. Botanik und bisherige Anwendung	109
2. Bisherige chemische Untersuchungen	111

	Seite
3. Isolierung und Strukturaufklärung von Melanervin	115
Spektroskopische Methoden	115
Abbaureaktionen	126
4. Darstellung von Melanervinderivaten	137
5. Isomelanervin und Derivate	150
6. Zur Konstitution und Stereochemie von Melanervin	156
7. Zur Biosynthese von Melanervin	161
ZUSAMMENFASSUNG	164
EXPERIMENTELLER TEIL	165
I. <u>Allgemeine physikalisch-chemische Verfahren</u>	165
1. Substanztrocknung	165
2. Schmelzpunktsbestimmungen	165
3. Polarimetrische Messungen	165
4. Osmometrische Molekulargewichtsbestimmungen . .	165
5. Elementaranalysen	166
6. pH-Messungen	166
7. Elektrometrische Endpunktstitraktionen	166
II. <u>Spektroskopische Methoden</u>	167
1. UV-VIS-Spektren	167
2. IR-Spektren	167
3. NMR-Spektren	167
4. Massenspektren	168
III. <u>Chromatographische Arbeitsmethoden</u>	169
1. Analytische Dünnschichtchromatographie	169
Sorptionismittel	169
Laufmittelsysteme	169
Detektionsmittel	170
2. Präparative Dünnschichtchromatographie	171
3. Säulenchromatographie	172
4. Gaschromatographie	173
IV. <u>Allgemeine chemische Arbeitsmethoden</u>	174
1. Saure Hydrolysen	174
2. Alkalische Hydrolysen	174
3. Acetylierungen	174
4. Methylierungen	175
5. Silylierungen	175
6. Katalytische Hydrierungen	176

	Seite
V. <u>Spezielle chemische Verfahren</u>	177
1. Methylierungsanalyse von Glykosiden im Mikro- maßstab	177
1.1 Permethylierung von Polyphenolglykosiden nach KUHN und TRISCHMANN	177
1.2 Permethylierung von Polyphenolglykosiden nach HAKOMORI	177
1.3 Permethylierung von Polyphenolglykosiden nach BRIMACOMBE	178
1.4 Permethylierung von PA-Glykosiden nach BRIMACOMBE	178
1.5 Hydrolyse von PM-Glykosiden	179
1.6 Reduktion von Aldosemethyläthern zu O-Methyl- alditolen	180
1.7 Acetylierung von Alditolmethyläthern zu O-Me- thyl-alditolacetaten	181
1.8 Oximierung von Aldosemethyläthern zu Methyl- aldoxim-methyläthern und anschließende Trimethyl- silylierung	181
1.9 Trifluoracetylierung von Aldosemethyläthern zu O-Methyl-aldose-trifluoracetaten	181
1.10 Kondensation von Aldosemethyläthern mit Anilin zu N-Phenylglykosylamin-methyläthern	181
1.11 Kondensation von Aldosemethyläthern mit Phenol zu Phenyl-O-glykosid-methyläthern	182
2. Peracetylierung von Polyphenolglykosiden im Mikromaßstab	182
3. Per-trimethylsilylierung von Polyphenolglyko- siden im Mikromaßstab	183
4. Abbaureaktionen mit Polyphenolen im Mikromaßstab	183
4.1 Alkaliabbau von Polyphenolen mit Natronlauge .	183
4.2 Alkalisch-reduktiver Abbau von Polyphenolen mit Natriumamalgam	184
4.3 Alkaliabbau von PM-Polyphenolen und PDM-Poly- phenolen mit alkohol.Kalilauge	184
4.4 Alkalisch-oxidativer Abbau von Polyphenolen .	184
4.5 Trimethylsilylierung der Abbauprodukte	185
5. Strukturaufklärung von Melanervin	186
5.1 Herkunft der Droge	186
5.2 Isolierung von Melanervin	186
5.3 Isolierung von Strobopinin und Kryptostrobin .	189
5.4 Dehydrierung von Melanervin mit Jod-Kaliumacetat	190

	Seite
5.5 Alkaliabbau von Melanervin	192
5.6 Aluminiumchlorid-Abbau von Melanervin	194
5.7 Methylierung von Methylphloroglucin- β -mono- methyläther	196
5.8 Methylierung von Methylphloracetophenon . . .	196
5.9 Acetylierung von Melanervin	197
5.10 Methylierung von Melanervin mit Dimethylsulfat	199
5.11 Alkaliabbau von Melanervinchalkon-pentamethyl- äther	200
5.12 Silylierung von Melanervin	202
5.13 Deuterierung von Melanervin	202
5.14 Isomerisierung von Melanervin	202
5.15 Acetylierung von Isomelanervin	203
5.16 Silylierung von Isomelanervin	205
5.17 Acetylierung von Strobopinin	205
5.18 Acetylierung von Kryptostrobin	207
5.19 Synthese von Bis-(2,4,6-trimethoxyphenyl)- phenylmethan	207
5.20 Syntheserversuch von Bis-(2,4,6-trimethoxy-3- methyl-phenyl)-phenylmethan	208
LITERATURVERZEICHNIS	210

VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN

	Seite
Abb. 1) Fragmentierungsmöglichkeiten der O-glykosidischen Bindung	5
Abb. 2) Abbausequenzen bei der Fragmentierung verschiedener PM-Quercetin-3-glykoside	6
Abb. 3) MS von Quercetin-7-glucosid-PMÄ und Quercetin-3-glucosid-PMÄ	7
Abb. 4) MS von Quercetin-4'-glucosid-PMÄ und Quercetin-3'-glucosid-PMÄ	7
Abb. 5) MS von Myricetin-3-rhamnosid-PMÄ und Rhamnocitrin-3-glucuronid-ME-PDMÄ	8
Abb. 6) Glykosidspaltung von PM-Isorhamnetin-3,7-diglykosiden	18
Abb. 7) MS von Isorhamnetin-3-gluco-7-rhamnosid-PMÄ und Isorhamnetin-3-rhamno-7-glucosid-PMÄ	19
Abb. 8) MS von Isorhamnetin-3-gluco-7-arabinosid-PMÄ und Isorhamnetin-3-arabino-7-glucosid-PMÄ	19
Abb. 9) Isorhamnetin-3,7-bisglucosid (III), PM- und PDM-Derivate (I) und (II)	22
Abb. 10) MS von Luteolin-7-rutinosid-PMÄ	24a
Abb. 11) MS von Luteolin-7-neohesperidosid-PMÄ	24a
Abb. 12) Fragmentierung des Tri-O-acetyl-xylopyranosyl-Restes	35
Abb. 13) Fragmentierung des Tetra-O-acetyl-glucopyranosyl-Restes	36
Abb. 14) Fragmentierung des Tri-O-acetyl-rhamnopyranosyl-Restes	37
Abb. 15) Fragmentierung des Di-O-acetyl-glucopyranuronido- γ -laktone-Restes	38
Abb. 16) MS von Apigenin-7-galaktosid-PA	41
Abb. 17) MS von Isorhamnetin-3-rutinosid-PA	42
Abb. 18) MS von Eriodictyol-7-neohesperidosid-PA	42
Abb. 19) Fragmentierung von Pruningallat-PA	49
Abb. 20) MS von Spinatin-PTMSÄ	53
Abb. 21) MS von Spinatin-PTDMSÄ	53
Abb. 22) MS von Malvidin-3-glucosid-PMÄ	55
Abb. 23) MS von Peonidin-3,5-diglucosid-PMÄ	56
Abb. 24) MS von Petunin-cumarat-PMÄ	56
Abb. 25) MS von PM-Aesculinsäure-ME	60
Abb. 26) MS von Isogentisin-3-glucosid-PMÄ	61
Abb. 27) MS von Emodin-8-glucosid-PMÄ	64
Abb. 28) MS von Emodin-6-rhamnosid-PMÄ	64

Abb. 29)	MS von Emodin-6-rhamno-8-glucosid-PA	68
Abb. 30)	MS von Emodin-8-gentiobiosid-PA	68
Abb. 31)	MS der Rhamnitolacetate I, II, III	73
Abb. 32)	GC von O-Methyl-Alditolacetaten	74
Abb. 33)	MS von 2,3,4-Tri-O-methyl-L-arabit-1,5-diacetat	75
Abb. 34)	MS von 2,3,4,6-Tetra-O-methyl-D-glucit-1,5-diacetat	75
Abb. 35)	MS von 2,3,4-Tri-O-methyl-D-glucit-1,5,6-triacetat	75
Abb. 36)	GC von O-Methyl-Aldosemethyloxim-TMS-äther	77
Abb. 37)	Fragmentierung der O-Methyl-Aldosemethyloxim-TMS-äther	79
Abb. 38)	MS von 2,3,4-Tri-O-methyl-L-rhamnosemethyloxim-5-trimethylsilyläther	79
Abb. 39)	MS von 2,3,4-Tri-O-methyl-L-arabinosemethyloxim-5-TMS-äther	80
Abb. 40)	MS von 2,3,4,6-Tetra-O-methyl-D-glucose-methyloxim-5-TMS-äther	80
Abb. 41)	MS von 2,3,4-Tri-O-methyl-D-glucosemethyloxim-5,6-bis-TMS-äther	80
Abb. 42)	GC von Phenyl-O-glykosid-methyläthern	82
Abb. 43)	MS von Phenyl-2,3,4-tri-O-methyl-L-arabinopyranosid	84
Abb. 44)	MS von Phenyl-2,3,4,6-tetra-O-methyl-D-glucopyranosid	84
Abb. 45)	MS von Phenyl-2,3,4-tri-O-methyl-D-glucopyranosid	84
Abb. 46)	GC von N-Phenyl-glykosylamin-methyläthern	85
Abb. 47)	MS von N-Phenyl-2,3,4-tri-O-methyl-L-arabinopyranosylamin	87
Abb. 48)	MS von N-Phenyl-2,3,4,6-tetra-O-methyl-D-glucopyranosylamin	87
Abb. 49)	MS von N-Phenyl-2,3,4-tri-O-methyl-D-glucopyranosylamin	87
Abb. 50)	Methylierungsanalyse von Guaijaverin	89
Abb. 51)	Methylierungsanalyse von Emodin-8-gentiobiosid	91
Abb. 52)	Fragmentierung der PTMS-Protocatechusäure	94
Abb. 53)	GC von Flavonoidabbauprodukten als PTMS-Derivate	95
Abb. 54)	Alkaliabbau von PDM-Flavonoid-Aglyka	98
Abb. 55)	MS von 2-Hydroxy-4,5-dimethoxy-6-(trideutero)-methoxy-acetophenon-TMS-äther	101
Abb. 56)	MS von Trideutero-anissäure-TMS-ester	101

Abb. 57)	MS von 2-Trimethylsilyloxy- ω ,6-bis-(trideuteromethoxy)-4-methoxyacetophenon	101
Abb. 58)	MS von 3,4-Bis-(trideuteromethoxy)-benzoesäure-trimethylsilylester	101
Abb. 59)	MS von 2,4,6-Tris-(trideuteromethoxy)-3-methylacetophenon	104
Abb. 60)	MS von p-Trideuteromethoxy-zimtsäure-trimethylsilylester	104
Abb. 61)	MS von 1,3-Bis-(trideuteromethoxy)-5-trimethylsilyloxybenzol	104
Abb. 62)	MS von 3,4-Bis-(trideuteromethoxy)-phenylessigsäure-trimethylsilylester	104
Abb. 63)	MS von PTMS-Hydrokaffeensäure	107
Abb. 64)	MS von 3,4-Dihydroxy-phenyl-propanol-1-tris-TMS-äther	107
Abb. 64a)	GC von Jaceosidin-Abbauprodukten (underivatisiert)	107
Abb. 65)	Blütenzweig und Einzelblüte von Melaleuca quinquenervia	110
Abb. 66)	Typische Myrtaceen-Inhaltsstoffe	112
Abb. 67)	Melaleuca-Inhaltsstoffe	114
Abb. 68)	Isolierungs-Schema für Melanervin	116
Abb. 69)	DC der Chloroformextrakte von Melaleuca quinquenervia	117
Abb. 70)	UV-Spektren von Melanervin	118
Abb. 71)	IR-Spektrum von Melanervin	119
Abb. 72)	NMR-Spektrum von Melanervin	120
Abb. 73)	MS von Melanervin	121
Abb. 74)	Zerfallschema von Melanervin	121
Abb. 75)	Schlüsselfragmente von Melanervin	122
Abb. 76)	DC der Dehydrierungsprodukte von Melanervin . .	123
Abb. 77)	IR-Überlagerungsspektrum von Strobopinin . . .	125
Abb. 78)	UV-Spektrum von Strobochrysin und Dehydromelanervin	126
Abb. 79)	DC der Alkali-Abbauprodukte von Melanervin . .	127
Abb. 80)	GC der NaOH-Abbauprodukte als PTMS-Derivate . .	128
Abb. 81)	IR-Überlagerungsspektrum von Methylphloroglucin .	129
Abb. 82)	NMR-Spektrum von Methylphloroglucin- β -methyläther	131
Abb. 83)	IR-Überlagerungsspektrum von Methylphloroglucin- β -methyläther	131
Abb. 84)	Synthese von Methylphloroglucin- β -methyläther .	132

Abb. 85)	DC der AlCl_3 -Abbauprodukte von Melanervin . . .	133
Abb. 86)	NMR-Spektrum von Methylphloracetophenon-trimethyl- äther	135
Abb. 87)	IR-Überlagerungsspektrum von Methylphloraceto- phenon	135
Abb. 88)	MS von Melanervin-tetraacetat	137
Abb. 89)	Fragmentierungsschema von Melanervin-tetraacetat	138
Abb. 90)	NMR-Spektrum von Melanervin-tetraacetat	139
Abb. 91)	IR-Spektrum von Melanervin-tetraacetat	140
Abb. 92)	IR-Spektrum von Melanervin-triacetat	140
Abb. 93)	IR-Spektrum von Melanervin-chalkon-pentamethyl- äther	141
Abb. 94)	MS von Melanervin-chalkon-pentamethyläther . .	142
Abb. 95)	Fragmentierungsschema von Melanervin-chalkon- pentamethyläther	142
Abb. 96)	NMR-Spektrum von Melanervin-chalkon-pentamethyl- äther	143
Abb. 97)	GC der PM-Melanervin-Abbauprodukte	145
Abb. 98)	Fragmentierungsschema von 2,4,6-Trimethoxy-5- methyl-3-(2,4,6-trimethoxy-tolyl)-benzyl- acetophenon	146
Abb. 99)	Fragmentierung von PM-Abbauprodukten	147
Abb.100)	Abbauprodukte aus Melanervin	149
Abb.101)	IR-Spektrum von Isomelanervin	151
Abb.102)	NMR-Spektrum von Isomelanervin	151
Abb.103)	NMR-Spektrum von Isomelanervin-triacetat . . .	153
Abb.104)	IR-Spektrum von Isomelanervin-triacetat	153
Abb.105)	NMR-Spektrum von Isomelanervin-tetraacetat . .	155
Abb.106)	IR-Spektrum von Isomelanervin-tetraacetat . . .	155
Abb.107)	^{13}C -NMR-Spektrum von Strobopinin	159
Abb.108)	^{13}C -NMR-Spektrum von Bis-(2,4,6-trimethoxyphenyl)- phenylmethan	159
Abb.109)	^{13}C -NMR-Spektrum von Melanervin	160

VERZEICHNIS DER TABELLEN

	Seite
Tab. 1) Flavonol-monoside (PMÄ)	12
Tab. 2) Flavonol-bioside und -trioside (PMÄ)	16
Tab. 3) Flavonol-diglykoside (PMÄ)	20
Tab. 4) Flavon-monoside (PMÄ)	24
Tab. 5) Flavon-bioside und -diglykoside (PMÄ)	25
Tab. 6) Flavanon-monoside (PMÄ)	28
Tab. 7) Flavanon-bioside und -diglykoside (PMÄ)	28
Tab. 8) Isoflavon-monoside (PMÄ)	30
Tab. 9) Isoflavon-bioside (PMÄ)	30
Tab. 10) Flavonoid-acylglykoside (PMÄ)	33
Tab. 11) Flavon-glykoside (PA)	43
Tab. 12) Flavonol-glykoside (PA)	44
Tab. 13) Flavanon-glykoside (PA)	47
Tab. 14) Isoflavon-glykoside (PA)	48
Tab. 15) Flavon- und Flavonolglykoside (PTMSÄ)	52
Tab. 16) Anthocyanine (PMÄ)	58
Tab. 17) Cumarin-O-glucoside (PMÄ)	60
Tab. 18) Xanthon-O-glykoside (PMÄ)	62
Tab. 19) Xanthon-O-glykoside (PA)	62
Tab. 20) Anthrachinon-O-glykoside (PMÄ)	65
Tab. 21) Anthrachinon-O-glykoside (PA)	67
Tab. 22) ¹³ C-NMR-Zuordnung von Melanervin	158

E I N L E I T U N G

Die Strukturaufklärung polyphenolischer Naturstoffe wie Flavonoide, Anthrachinone, Cumarine und Xanthone und deren Glykoside allein mit Hilfe spektroskopischer Methoden ist durch den Umstand erschwert, daß sich diese Verbindungsklassen durch eine große Vielfalt von Substitutionsmustern auszeichnen, wobei Isomere oft nur schwer zu unterscheiden sind. Im allgemeinen ist eine größere Zahl von Vergleichsspektren und -daten, zusammen mit den Spektren verschiedener Derivate nötig, um Fehlschlüsse bei der Interpretation der Spektren zu vermeiden. Dies gilt auch für die Massenspektrometrie. Seitdem die modernen Verfahren instrumenteller Analytik zur Verfügung stehen, hat zwar die Zahl der aufgeklärten Verbindungen stark zugenommen, in gleichem Umfang mußten aber auch unrichtige Strukturvorschläge revidiert werden. Eine Ausnahme machen hier nur die durch Röntgenstrukturanalyse aufgeklärten Moleküle.

Ziel der vorliegenden Arbeit sollte es sein, durch eine Kombination chemischer, gaschromatographischer und massenspektrometrischer Verfahren die Analytik von Polyphenolen und deren Glykoside im Mikromaßstab weiter zu entwickeln und zu verbessern. Die Anwendbarkeit der neu ausgearbeiteten Methoden mußte an Beispielen mit geringem Substanzaufwand erprobt werden.

Durch die Strukturermittlung eines im Jahre 1968 in unserem Arbeitskreis aus Melaleuca quinquenervia isolierten, bisher aber wegen seines komplizierten Aufbaus nicht aufgeklärten Polyphenols, sollte die Leistungsfähigkeit dieser kombinierten Analysenverfahren unter Beweis gestellt werden.

A L L G E M E I N E R T E I L

I. MS von Flavonoid-O-glykosiden

1.0 Bisherige Arbeiten

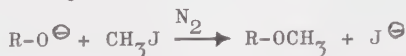
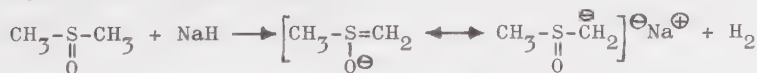
Die Massenspektroskopie von Flavonoiden ist seit 1963 in chronologischer Reihenfolge von REED und WILSON (1), BARNES und OCCOLOWITZ (2), AUDIER (3), PELTER und Mitarb. (4,5), BOWIE und CAMERON (6), KINGSTON (7), VALESI (8), CAMPBELL (9) und anderen systematisch bearbeitet worden. Als aromatische Verbindungen zeigen die Flavonoide ausgeprägte Molekülpeaks. Typische Fragmentierungswege sind CO-Abspaltung und Retro-Diels-Alder-Spaltung. Eine zusammenfassende Darstellung der EI-MS verschiedener Flavonoidklassen findet sich bei MABRY und MARKHAM (10), sowie DREWES (11).

Die Massenspektren von Flavonoid-C-glykosiden, von PROX (12), CHOPIN (13) und BOUILLANT (14) eingehend untersucht, zeigen charakteristische H_2O -Verluste vom Moleküllion abwärts (15). Demgegenüber ergeben Flavon-O-glykoside (12) im wesentlichen die Spektren des jeweiligen Aglucons, d.h. der Zucker wird thermisch abgespalten und abgebaut. FD-MS-Spektren (16) bilden eine Ausnahme und sollen hier nicht berücksichtigt werden. Es ist deshalb erforderlich, die Glykoside zu derivatisieren. Als flüchtige Derivate für die MS werden bevorzugt Peracetate (PA), Permethyläther (PM) und Pertrimethylsilyläther (PTMS) eingesetzt. Diese Möglichkeit zur MS-Strukturanalyse von Flavonoidglykosiden ist bisher wenig ausgenutzt worden. WEINGES (17) beschrieb 1968 die MS-Fragmentierung einiger Flavonoid-O-glykosid-acetate, während PELLIZARI (18) die Silyläther einiger Polyphenolglykoside zur GC-MS-Analyse verwendete. 1972 und in der Folgezeit haben dann SCHMID und Mitarb. (19-22) gezeigt, daß sich Flavonoidbioside und -trioside als Perdeuteromethyläther gut zur Strukturaufklärung durch die Massenspektroskopie eignen. Auf diese Weise erhält man Informationen über die Struktur der Aglyka und Zucker.

2.0 Eigene Arbeiten über Permethyläther

Etwa zur gleichen Zeit begannen wir mit einer systematischen massenspektroskopischen Untersuchung von Flavonoid-mono- und di-glykosiden in Form ihrer Permethyläther (23,24), wobei zunächst die geeignetste Permethylierungsmethode gefunden werden mußte.

Über die Permethylierung von Flavonoid-glykosiden hat AURNHAMMER (25) aus unserem Arbeitskreis grundlegende Untersuchungen angestellt. Nach seinen Ergebnissen kann man eine modifizierte PURDIE-Methylierung (26) nach KUHN, TRISCHMANN und Mitarb. (27-29) im Halbmikromaßstab anwenden. Im mg-Bereich erfordert die Methode jedoch mindestens eine Nachmethylierung, wobei auch mehrere Nebenprodukte entstehen. Wir versuchten deshalb, die radikalere Methode der Permethylierung nach HAKOMORI (30). Die Glykoside werden in Mengen von 0.1 - 2 mg in DMSO gelöst. Durch Reaktion von NaH mit dem Solvens entsteht das Natrium-methylsulfinylmethid (Dimsyl-Na), welches über das Carbanion (31) Alkoxy- und Phenoxy-Anionen bildet, sodaß in kurzer Zeit mit CH_3J eine vollständige Methylierung erreicht werden kann.



Die Vollständigkeit der Methylierung wird im allgemeinen IR-spektroskopisch überprüft. Wir haben jedoch festgestellt, daß bei dieser Mikromethode als Nebenprodukte weniger partiell methylierte Produkte, sondern durch Übermethylierung C-Methyl-Homologe erhalten werden (M+14, M+28 Peaks). Dies gilt besonders für Flavonol-glykoside. Deshalb bevorzugten wir meist die weniger drastische Variante der Permethylierung nach BRIMACOMBE (32), bei der DMF als Lösungsmittel verwendet wird.

Dieses dient nicht nur als polares, aprotisches Solvens, sondern zugleich zur Beschleunigung der Alkylierung (33). Auch SCHMID und BOUILLANT (34,35) haben die BRIMACOMBE-Methode verwendet. Sie ist einfach und schnell (innerhalb 2 Stdn.) durchzuführen.

Die Methylierungsprodukte liefern, wie die DC-Überprüfung ergab, im allgemeinen neben einer Hauptzone mehrere Nebenzone. Die Abtrennung dieser Nebenprodukte kann über Kieselgelplatten erfolgen. Die MS-Spektren der gereinigten und ungereinigten Produkte zeigten aber, daß die Nebenprodukte, wenn sie nicht mehr als 10 - 20% überschreiten, bei der Auswertung kaum stören.

Die so erhaltenen PM-Glykoside unterliegen der MS-Spaltung an der C-O-Bindung zum Aglykon mit oder ohne H-Wanderung. Der aromatische Flavonoidanteil beeinflußt die Abspaltung des Zuckers derart, daß überwiegend das Glykosyl-Kation entsteht. Gleichzeitig vereinfacht sich auch die Fragmentierung des Zuckers (36). Je nach Ladungslokalisierung können verschiedene Fragmentierungsmechanismen postuliert werden, wobei Radikal- und Neutralteilchen im MS bekanntlich nicht auftreten (Abb. 1, S. 5).

Das Aglykon erscheint daher stets mit hoher Intensität als sog. A+H-Peak. Oft bildet es den Base-Peak. Seine weitere Fragmentierung findet in bekannter Weise statt (10), jedoch sind die RDA-Fragmente bei PM-Flavonoid-glykosiden weniger stark ausgeprägt. Sie können - falls erkennbar - wertvolle Hinweise auf das Substitutionsmuster ergeben, besonders wenn das Glykosid einer Perdeuteromethylierung unterworfen wird.

Beim Abbau der Zuckeranteile erlauben die charakteristischen Folgen von Methanol-Eliminierungen die verschiedenen Zucker zu unterscheiden (Abb. 2, S. 6).

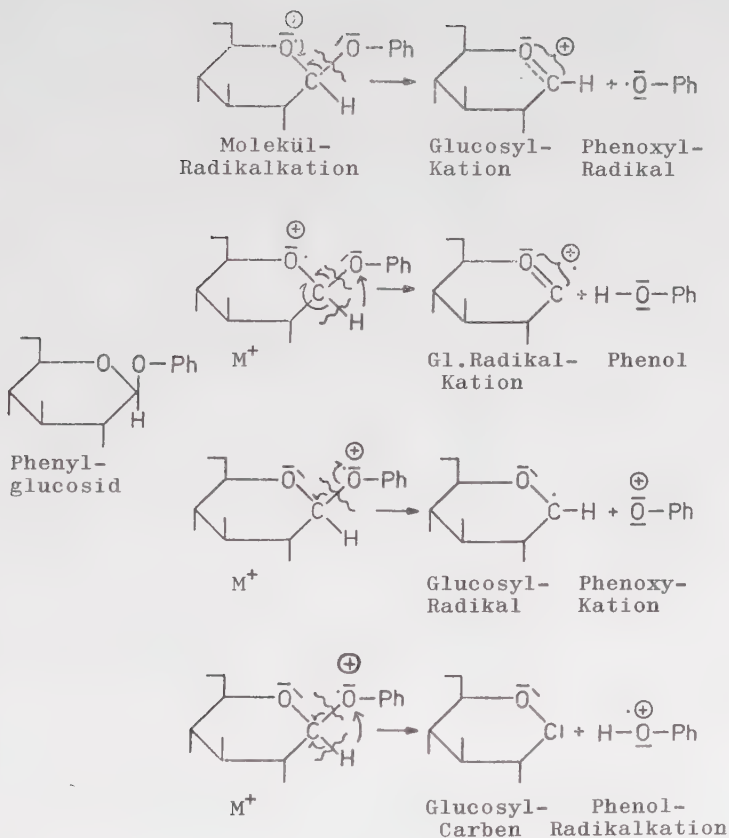


Abb. 1

Fragmentierungsmöglichkeiten der O-glykosidischen Bindung

Folgende Sequenzen sind charakteristisch für:

Hexopyranoside	218, 187, 155, 111
Pentopyranoside	175, 143, 111
6-Desoxyhexopyranoside	189, 157, 125
Hexopyranuronide	201, 169, 141

Zusätzlich treten stets kleinere Fragmente auf, die allgemein für Methylzucker typisch sind. Die Strukturen dieser Fragmente sind seit den Studien von KOCHETKOV und CHIZHOV (36,37) und HEYNS und SCHARMANN (38-40) bekannt.

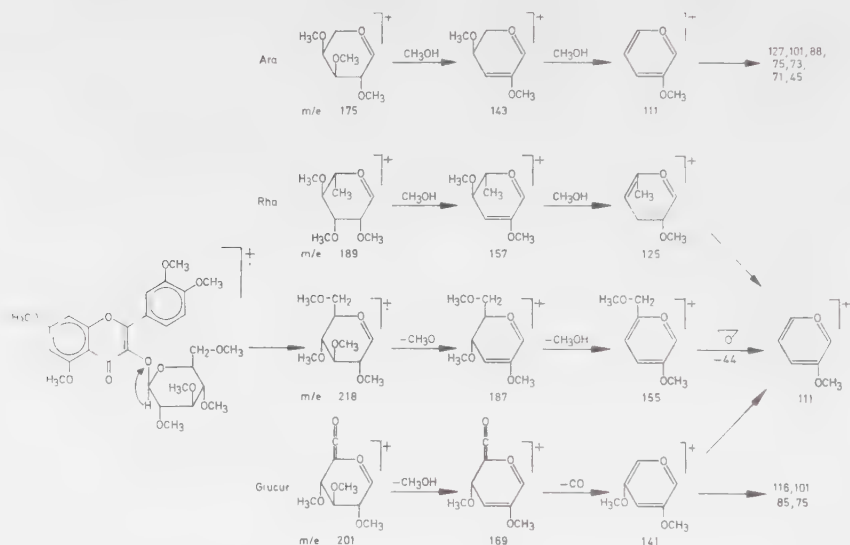


Abb. 2

Abbausequenzen bei der Fragmentierung verschiedener
PM-Quercetin-3-glykoside

2.1 PM-Flavonol-monoside

Unsere EI-MS-Arbeiten an Flavonol-monoglykosid-permethy-l-äthern haben gezeigt, daß O-glykosidische Zuckerbindungen in 5- und 3-Position leichter gespalten werden als jene in 7-Stellung. Wie aus Abb. 3, S. 7 und Tab. 1, S.12, ersicht-lich, kann im Falle der 3-O-monoside, z.B. bei PM-Quercetin-3-glucosid (Isoquercitrin-PMÄ) der Molekülpeak nicht oder nur schwach erkannt werden (rel.Int. < 1%). Dagegen zeigen 7-O-Monoside wie z.B. PM-Quercetin-7-glucosid (Quercimeritrin-PMÄ)

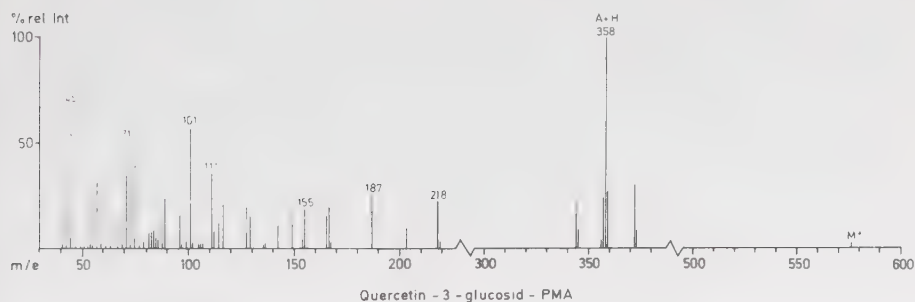
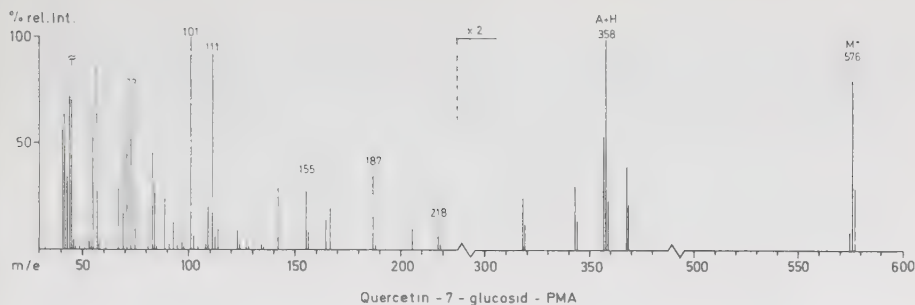


Abb. 3

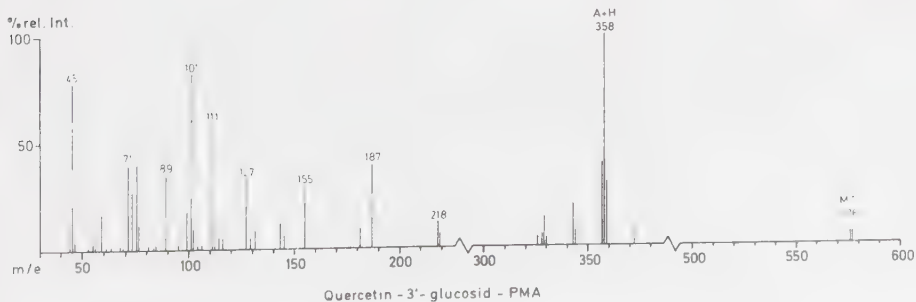
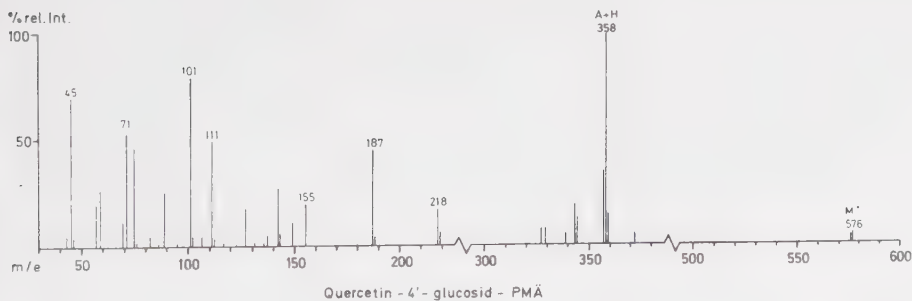


Abb. 4

unter den von uns gewählten instrumentellen und experimentellen Bedingungen einen M^+ -Peak von 80% rel.Int. und höher, im Vergleich zum A+H Peak, den wir als 100% gesetzt haben. Die intensiven Peaks bei m/e 218, 187, 155, 111 indizieren die Anwesenheit von Glucose oder Galaktose.

Die Flavonol-4'- und 3'-O-monoside nehmen in dieser Hinsicht eine Zwischenstellung ein, d.h. sie haben kleine aber noch gut erkennbare Molekülpeaks von 2 - 10% rel.Int. (Abb. 4, S.7).

Dieses Verhalten der Zuckerfragmentierung ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der sauren Hydrolyse (41,42).

Flavonol-O-glykoside mit anderen Zuckerkomponenten als Glucose oder Galaktose können leicht unterschieden werden, wie das Beispiel des PM-Myricitrins (Myricetin-3-rhamnosid-PMÄ) zeigt (Abb. 5). Ein extrem kleiner M^+ -Peak bei 576 mu^* und die Zuckerfragmente m/e 189, 188, 157 und 125 weisen auf die 3-Verknüpfung einer Rhamnose hin.

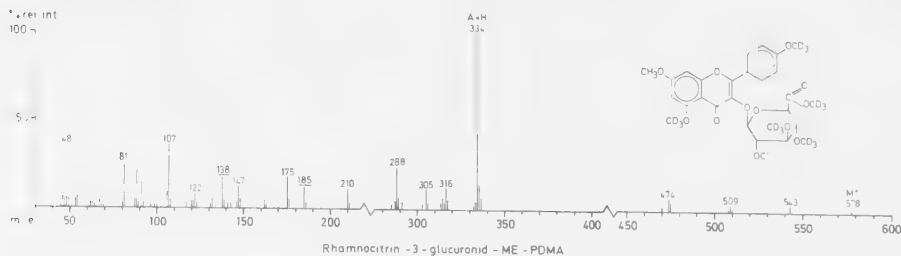
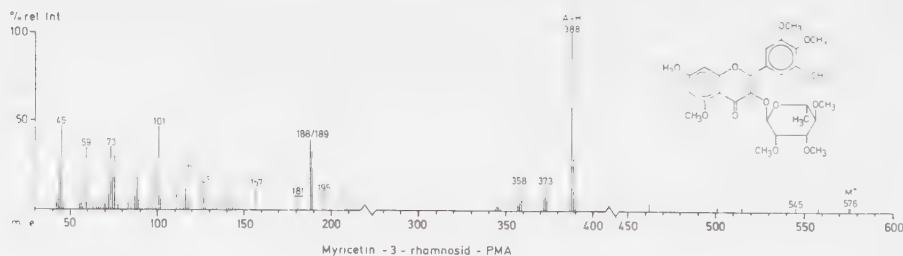
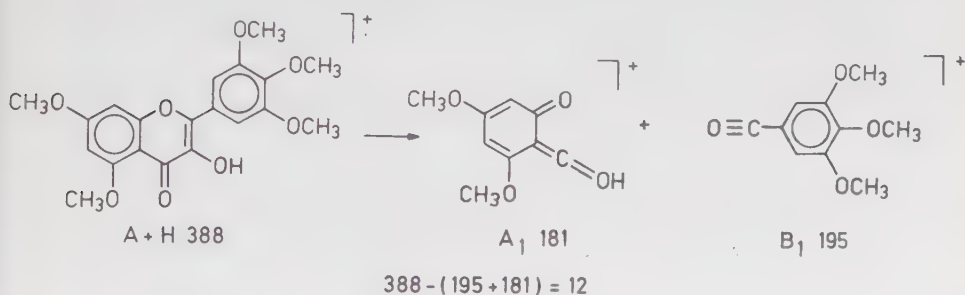


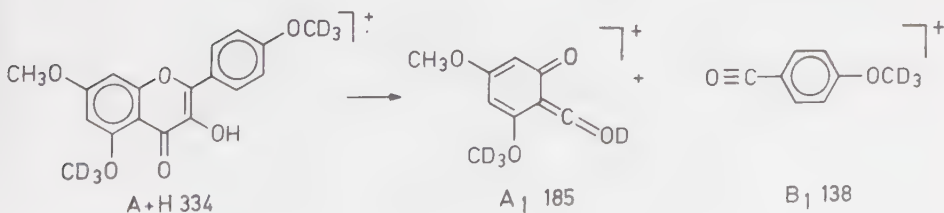
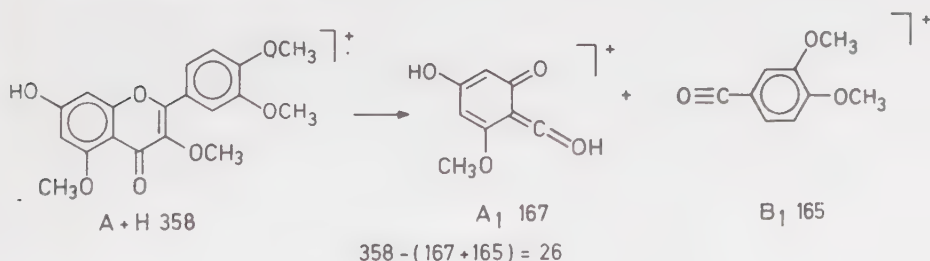
Abb. 5

*) mu , amu , u , MZ , $ME = 1$ Masseneinheit

Der A+H-Peak bei 388 mu ist repräsentativ für ein Penta-methoxyflavonol. In Verbindung mit den RDA-Fragmenten bei 181 mu für den A-Ring und 195 mu für den B-Ring kann somit ein Myricetin-3-rhamnosid mit einiger Sicherheit erkannt werden. Aus der Differenz von 12 mu zum A+H-Peak ($388 - (195 + 181) = 12$) läßt sich auf die 3-Hydroxyl-Gruppe schließen.



Im Falle einer 3-Methoxy-Substitution (z.B. bei PM-Quercetin-7-glucosid) ergibt die Differenz zur Summe der RDA-Fragmente 26 Masseneinheiten.



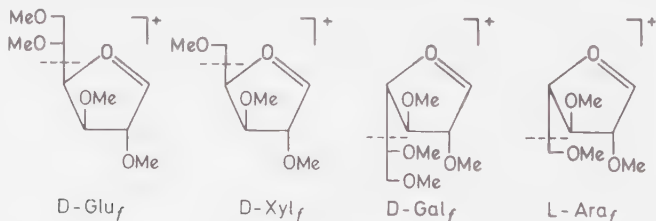
Mit noch größerer Sicherheit kann das Substitutionsmuster des Flavons nach Perdeuteromethylierung erkannt werden. Bei dem perdeuteromethylierten Rhamnocitrin-3-glucuronid (43) zeigten die RDA-Fragmente bei 185 und 138 m/e klar, daß die Methoxygruppe im A-Ring zu lokalisieren ist (Abb. 5, S. 8).

6-Methoxy- bzw. 6-CD₃O-Substitution äußert sich durch starke Peaks bei (A+H)-15 bzw. (A+H)-18, die in ihrer Intensität den A+H-Peak übertreffen können.

Wie bereits erwähnt, sind RDA-Fragmente in den Glykosidspektren häufig zu schwach, um mit Sicherheit erkannt zu werden (Tab. 1, S. 12). Das bei der Methylierungsanalyse nach Hydrolyse anfallende Aglykon bietet die Möglichkeit, dieselben RDA-Fragmente mit erhöhter Intensität zu ermitteln. Ferner geben die Abbauprodukte des Aglykons Aufschluß über das Substitutionsmuster, wie später noch erläutert werden wird.

Glucuronide werden durch Permethylierung in ihre Methylester überführt und geben sich somit durch eine Methanolabspaltung vom Molekulation zu erkennen (44,45). M⁺ ist hier im allgemeinen ausgeprägter. Bei Deuteromethylierung werden die Zuckersequenzen nach den m/e-Werten 210, 175 und 147 verschoben.

Wie bekannt, spalten PM-Aldofuranosen bevorzugt die exocyclische Seitenkette (m/e 89 bzw. 45) ab und sind deshalb in ihrer Fragmentierung von den PM-Pyranosen zu unterscheiden. (36,46). Das gleiche gilt nach unseren Untersuchungen für deren phenolisch gebundene Glykosylreste.



Es eröffnet sich somit die Möglichkeit, die auf dem Flavonoidsektor beschriebenen Glykofuranoside (47), die bis jetzt in keinem Fall durch Synthese endgültig bewiesen wurden, durch MS ihrer Permethyloprodukte nachzuweisen.

Ein von uns untersuchtes Quercetin-3-arabinofuranosid (Avicularin) ließ sich durch das Auftreten zusätzlicher Peaks von Quercetin-3-arabinopyranosid (Guaijaverin) differenzieren. Der Abbau des letzteren verhält sich wie in Abb. 2, S. 6, beschrieben, während das Pentofuranosid durch Peaks bei m/e 129, 115 und 89 charakterisiert wird.

Pentopyranoside: 175, 174, 143, 116, 111, 101, 99, 88, 75,
71, 45 mu

Pentofuranoside: 175, 174, 143, 129, 115, 111, 101, 99, 89,
74, 71, 45 mu

Diastereomere PM-Zucker wie D-Xylose und D-Arabinose oder D-Glucose und D-Galaktose zerbrechen in gleicher Reaktionsfolge, wobei nur Intensitätsunterschiede ermittelt wurden (46,48,49). Nach unseren Ergebnissen sind Unterscheidungsmöglichkeiten kaum gegeben, auch nicht bei Aufnahme der isomeren PM-Verbindungen unter völlig gleichen Bedingungen.

T a b e l l e 1

Flavonol-monoside m/e (rel. Int.%)

	A+H	M ⁺	RDA-Fragmente	
			A ₁	B ₁
Kämpferol-7-glucosid-PMÄ (Populin)	328 (100)	546 (86)	-	- 135 (25)
Kämpferol-3-glucosid-PMÄ (Astragalin)	328 (100)	546 (0.3)	-	- 135 (18)
Kämpferol-3-glucuronid-ME-PMÄ	328 (100)	560 (0.5) 528 (3) M-32	181 (8)	135 (52)
Rhamnocitrin-3-glucuronid-ME-PMÄ	334 (100)	578 (1) 543 (1) M-35	185 (12)	138 (19)
Quercetin-3-glucosid-PMÄ (Isoquercitrin)	358 (100)	576 (0.8)	181 (5)	165 (16)
Quercetin-3-glucuronid-ME-PMÄ (Miquelianin)	358 (100)	590 (2) 558 (1) M-32	-	- 165 (20)
Quercetin-3-galaktosid-PMÄ (Hyperosid)	358 (100)	576 (0.2)	181 (3)	- -
Quercetin-3-xylosid-PMÄ	358 (100)	532 (0.1)	-	- 165 (10)
Quercetin-3-arabinosid-PMÄ (Guaijaverin)	358 (100)	532 (0.2)	181 (3)	165 (9)
Quercetin-3-arabinosid-PMÄ (Avicularin)	358 (100)	532 (0.1)	181 (5)	165 (15)
Quercetin-4'-glucosid-PMÄ (Spiraeosid)	358 (100)	576 (4)	181 (8)	151 (10)
Quercetin-5-glucosid-PMÄ	358 (100)	576 (0.8)	-	- 165 (20)

Fortsetzung Seite 13

Fortsetzung Tabelle 1

	A+H	M ⁺	RDA-Fragmente	
			A ₁	B ₁
Quercetin-3'-glucosid-PMÄ	358 (100)	576 (8)	181 (10)	151 (10)
Quercetin-7-glucosid-PMÄ (Quercimeritrin)	358 (100)	576 (90)	167 (18)	165 (12)
Quercetin-3-rhamnosid-PMÄ (Quercitrin)	358 (100)	546 (0.2)	-	165 (14)
Isorhamnetin-3-glucosid-PMÄ	358 (100)	576 (0.3)	181 (65)	-
Isorhamnetin-3-galaktosid-PMÄ (Cacticin)	358 (100)	576 (0.1)	-	165 (10)
Myricetin-3-rhamnosid-PMÄ (Myricitrin)	388 (100)	576 (0.5)	181 (7)	195 (13)
Eupatolitin-3-rhamnosid-PMÄ (Eupatolin)	388 (100) 373 (88) A+H-15	576 (0.2)	-	165 (5)
Patuletin-3-glucosid-PMÄ	388 (100) 373 (200) A+H-15	606 (0.6)	-	-
Jaceidin-7-glucosid-PMÄ (Jacein)	388 (100) 373 (125) A+H-15	606 (95)	183 (2)	165 (4)
Axillarin-4'-glucuronid-ME-PMÄ (Spinatin)	388 (100) 373 (62) A+H-15	620 (7) 588 (2) M-32	-	151 (48)

2.2 PM-Flavonol-bioside und -trioside

SCHMID (19) und Mitarb. (20-22) untersuchten 6 perdeuteromethylierte Flavonolbioside und 4 Flavonoltrioside, darunter Diglykoside mit Biosid- und Triosidanteilen. Sie fanden in Analogie zu permethylierten Disacchariden (50), daß sich $1 \rightarrow 2$ und $1 \rightarrow 6$ verknüpfte Disaccharidanteile in 3-Position in ihren Massenspektren unterscheiden. Von den bisher in Flavonoiden gefundenen Disaccharidbausteinen besitzen alle mit einer einzigen Ausnahme (Rungiose) (51) $1 \rightarrow 2$ oder $1 \rightarrow 6$ -Verknüpfung. Bei Flavonol-3-biosiden sind die weitaus häufigsten Rutinose und Sophorose. In Trisaccharidbausteinen können auch $1 \rightarrow 3$ und $1 \rightarrow 4$ -Verknüpfungen vorkommen (Rhamninose, Sorborose).

Zur MS-Differenzierung dienen folgende Fragmente:

$1 \rightarrow 6$ Disacch.

A+H

A+S'

A+S'+60

T+S-H

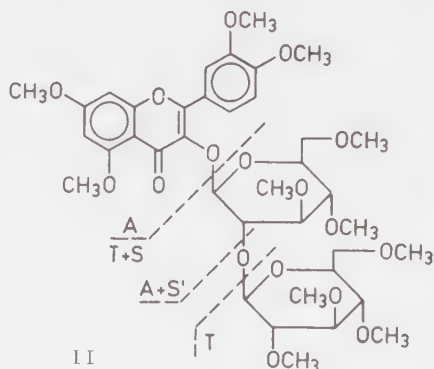
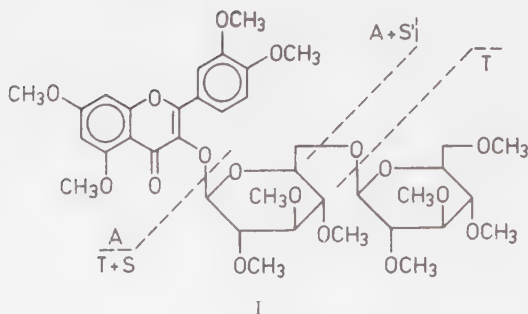
$1 \rightarrow 2$ Disacch.

A+H(+H)

A+S'+30

T+S

T+S-32



I = Quercetin-3-gentiobiosid-PMÄ

II = Quercetin-3-sophorosid-PMÄ

Die Möglichkeit der MS-Unterscheidung soll anhand der Isomeren Quercetin-3-sophorosid-PMÄ und Quercetin-3-gentiobiosid-PMÄ diskutiert werden (Tabelle 2, S. 16).

Der terminale Zucker T läßt sich durch seine Fragmentierungsfolge m/e 218, 187, 155, 111, 101 als Hexose zuordnen. Der Sekundärzucker S erscheint mit schwachen Peaks bei m/e 204, 173, 142, die meist im "Untergrund"-Spektrum verlorengehen. Der T+S-Peak m/e 422 (Disaccharidfragment) tritt beim Gentiobiosid auf, fehlt aber beim Sophorosid. Dafür tritt ein T+S-32-Bruchstück bei m/e 391 auf. Der A+H-Peak wird bei Sophorosen von einem relativ intensiven A+2H-Peak begleitet. Der A+S'-Peak m/e 545 repräsentiert die Monosid-Einheit und hat einen A+S'+60-Begleiter von m/e 605 beim Gentiobiosid im Gegensatz zu einem A+S'+30-Peak beim Sophorosid.

CHARI (52), der PM-Sophorose und Kojibiosid sowie Sambubiosid und 2-O- α -D-Xylosyl-glucosid untersuchte, konnte Intensitätsunterschiede beim Vergleich der T+S und T-Fragmente feststellen und daraus die Möglichkeit der Unterscheidung interglykosidischer α - und β -Verknüpfungen ableiten.

Bei der MS-Überprüfung weiterer Flavonolbioside fanden wir die von SCHMID aufgestellten Regeln im allgemeinen bestätigt. Die Rutinoside ergaben deutliche T+S-Peaks bei 392 ME und ausgeprägte A+S'+60-Peaks. Alle Molekülpeaks lagen unter 0.1% rel.Int., ebenso die M-32 und M-64-Peaks.

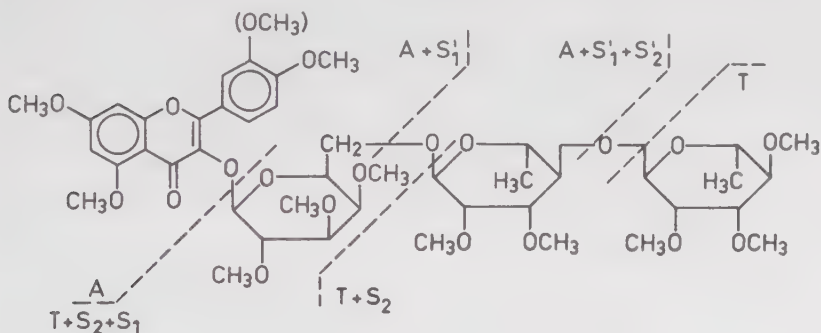
Bei der massenspektroskopischen Untersuchung von PM-Flavonoltriosiden (53) konnten alle für die Strukturen aufschlußreichen Fragmente erhalten werden. Als terminaler Zucker T und als endständige Disaccharideinheit T+S₂ wurden Rhamnose (189 mu) und Dirhamnose (362 mu) erkannt. Auch der Trisaccharid-Baustein Dirhamno-galaktose ließ sich bei m/e 566 finden (Tabelle 2, S. 16). Dadurch bestätigte sich die Struktur der Xanthorhamnine nach Permethylierung.

T a b e l l e 2

Flavonol-bioside und -trioside m/e (rel. Int. %)

	A+H A+2H	A+S'	A+S'+3O A+S'+6O	T	T+S	T+S-32
Kämpferol-3-sophorosid-PMÄ	328 (100) 329 (48)	515 (4)	545 (8)	218 (14)	-	391 (18)
Kämpferol-3-sambubiosid-PMÄ (Leucosid)	328 (100) 329 (50)	515 (3)		175 (110)	379 (7)	
Kämpferol-3-(2-O- α -D-xylosyl-) β -D-glucosid-PMÄ	328 (100) 329 (53)	515 (3)		175 (60)	379 (2)	
Quercetin-3-sophorosid-PMÄ (Carmenosid)	358 (100) 359 (43)	545 (2)	575 (5)	218 (14)	-	391 (15)
Quercetin-3-kojibiosid-PMÄ	358 (100) 359 (51)	545 (2)	575 (6)	218 (7)	-	391 (6)
Quercetin-3-gentiobiosid-PMÄ	358 (100) 359 (27)	545 (3)	605 (2)	218 (12)	422 (8)	
Quercetin-3-rutinosid-PMÄ (Rutin)	358 (100) 359 (22)	545 (2)	605 (1)	189 (4)	392 (2)	
Isorhamnetin-3-rutinosid-PMÄ (Narcissin)	358 (100) 359 (19)	545 (2)	605 (1)	189 (5)	392 (1)	
Rhamnocitrin-3-rhamminosid-PMÄ	328 (100) 329 (20)	515 (3) 689 (1)	A+S' ₁ +S' ₂	189 (80)	362 (12) 566 (1)	T+S ₂ +S ₁
Rhamnazin-3-rhamminosid-PMÄ (Xanthorhamnin C)	358 (100) 359 (22)	545 (4) 719 (1)	A+S' ₁ +S' ₂	189 (60)	362 (15) 566 (5)	T+S ₂ +S ₁

Schließlich zeigte sich auch ein $A+S'_1$ -Peak bei 515 (bzw. 545) m/e und ein $A+S'_1+S'_2$ -Peak bei 689 (bzw. 719) m/e .



2.3 PM-Flavonol-diglykoside

Es lag nahe, das Studium der Peakintensitäten auch auf permethylierte Diglykoside auszudehnen. Analog zu den Monosiden werden auch hier in 3-Position gebundene Zucker leichter abgebaut. Flavonol-3,7-diglykoside ergeben intensitätsstarke Peaks (40-50%) gegenüber den A+H-Peaks (100%) nach Abspaltung des 3-O-Zuckers. Schwache Signale von weniger als 1% werden nach Abspaltung des 7-O-Zuckers vom Molekölion erhalten (23). Dies wird durch ein Schema verdeutlicht (Abb. 6, S. 18). Die Abspaltung der 3-(und 5-O-Zucker) wird offenbar dadurch begünstigt, daß intramolekulare 5-Ring- (oder 6-Ring)-Chelate entstehen. Hieraus resultiert dann ein A+H+7-O-Zuckerfragment von hoher Intensität.

Diese Fragmentierung sei an zwei Paaren isomerer Diglykoside demonstriert (Abb. 7, Abb. 8, S. 19). Isorhamnetin-3-glucosid-7-rhamnosid-PMÄ ergibt einen starken A+H+Rhamnose-Peak bei m/e 532 entsprechend der Verknüpfung von Rhamnose in 7-Position.

Der A+H+Glucose-Peak erscheint bei m/e 562 mit nur 0.5%iger Intensität.

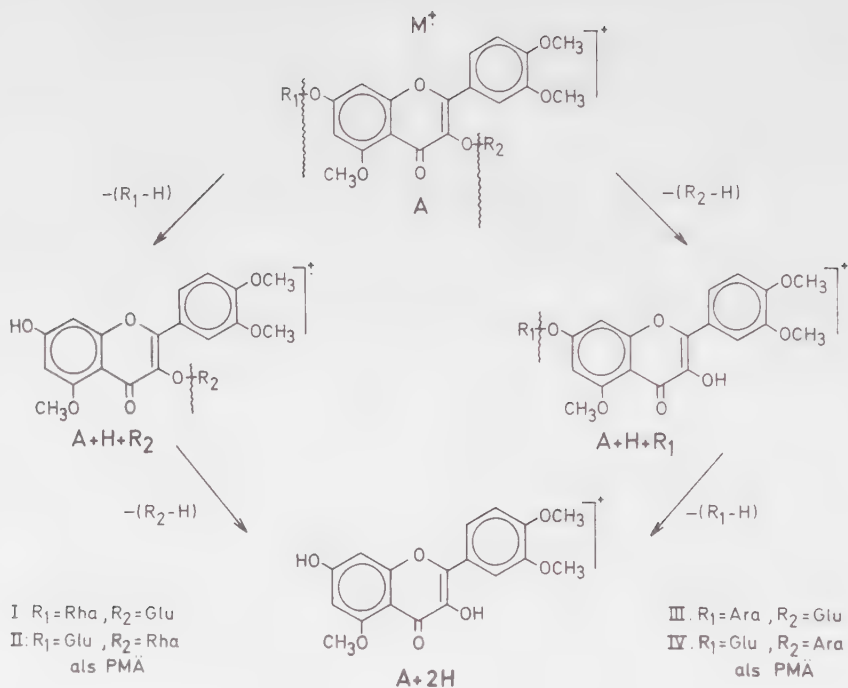
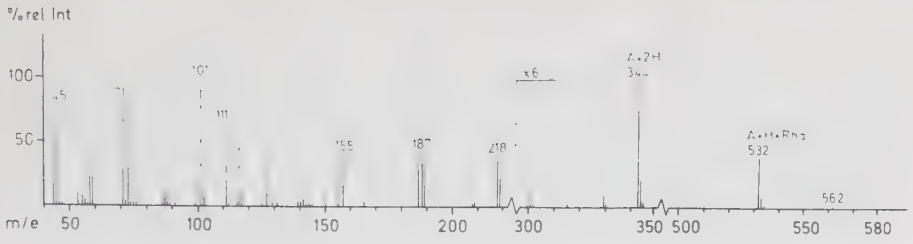


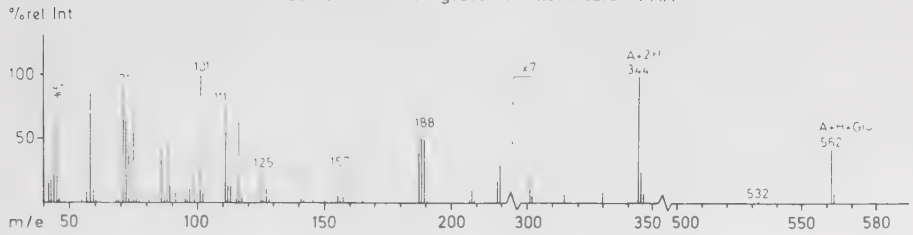
Abb. 6

Glykosidspaltung von PM-Isorhamnetin-3,7-diglykosiden

- I: Isorhamnetin-3-glucosid-7-rhamnosid-PMÄ
 A+H+Rha m/e 532 (40%); A+H+Glu m/e 562 (0.5%)
- II: Isorhamnetin-3-rhamno-7-glucosid-PMÄ
 A+H+Glu m/e 562 (42%); A+H+Rha m/e 532 (1.4%)
- III: Isorhamnetin-3-glucosid-7-arabinosid-PMÄ
 A+H+Ara m/e 518 (40%); A+H+Glu m/e 562 (0.5%)
- IV: Isorhamnetin-3-arabino-7-glucosid-PMÄ
 A+H+Glu m/e 562 (45%); A+H+Ara m/e 518 (1%)

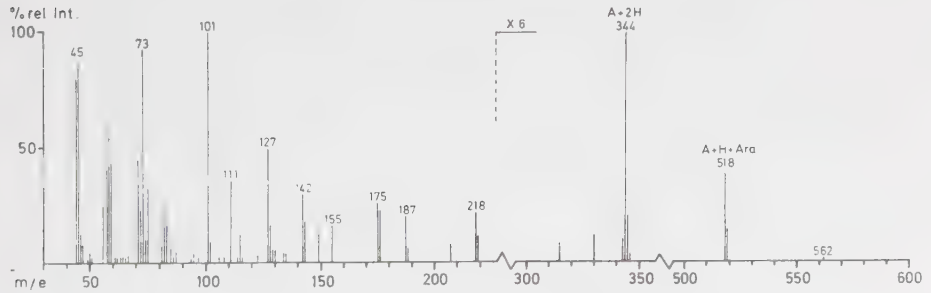


Isorhamnetin - 3 - glucoside - 7 - rhamnoside - PMA

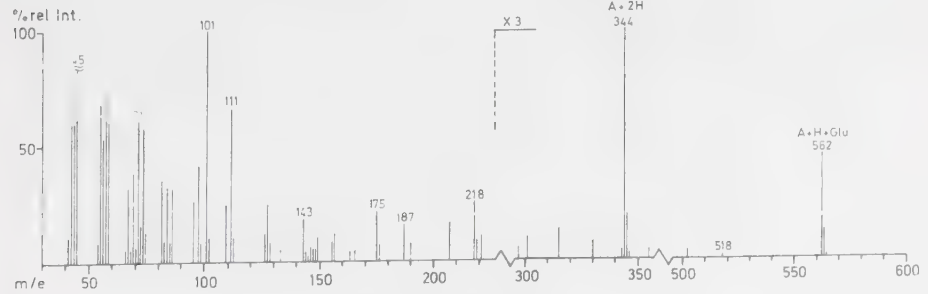


Isorhamnetin - 3 - rhamnoside - 7 - glucoside - PMA

Abb. 7



Isorhamnetin - 3 - glucoside - 7 - arabinoside - PMA



Isorhamnetin - 3 - arabinoside - 7 - glucoside - PMA

Abb. 8

T a b e l l e 3
Flavonol-diglykoside m/e (rel.Int.%)

	A+2H			M ⁺	
Kämpferol-3,7-diglucosid-PMÄ (Paeonisid)	314 (100)	532 (37)	A+H+Glu	750	-
Kämpferol-3,7-dirhamnosid-PMÄ (Lespedin, Kämpferitrin)	314 (100)	502 (47)	A+H+Rha	690	-
Kämpferol-3-arabino-7-rhamnosid- PMÄ	314 (100)	502 (44) 488 (0.5)	A+H+Rha A+H+Ara	676	-
Isorhamnetin-3,7-diglucosid-PMÄ	344 (100)	562 -	A+H+Glu	780	-
Quercetin-3,7-diglucosid-PMÄ	344 (100)	562 (5)	A+H+Glu	780	-
Quercetin-3,4'-diglucosid-PMÄ	344 (100)	562 (5)	A+H+Glu	780	-
Quercetin-4',7-diglucosid-PMÄ	344 (100)	562 (46)	A+H+Glu	780	(2)
Isorhamnetin-3-gluco-7-rhamnosid- PMÄ	344 (100)	532 (40) 562 (0.5)	A+H+Rha A+H+Glu	750	-
Isorhamnetin-3-rhamno-7-glucosid- PMÄ	344 (100)	562 (42) 532 (1.4)	A+H+Glu A+H+Rha	750	-
Isorhamnetin-3-gluco-7-arabino- sid-PMÄ (Hunnemannsid)	344 (100)	518 (40) 562 (0.5)	A+H+Ara A+H+Glu	736	-
Isorhamnetin-3-arabino-7-gluco- sid-PMÄ	344 (100)	562 (45) 518 (1)	A+H+Glu A+H+Ara	736	-
Quercetin-3-xylo-7-glucosid-PMÄ	344 (100)	562 (48) 518 (0.7)	A+H+Glu A+H+Xylo	736	- -
Quercetin-3-rhamno-7-glucosid-PMÄ	344 (100)	562 (50) 532 (0.8)	A+H+Glu A+H+Rha	750	-
Kämpferol-3-robinobio-7-rhamno- sid-PMÄ (Robinin)	314 (100)	706 - 502 (46)	A+H+Rob A+H+Rha	894	-
Quercetin-3-rutino-7-glucosid-PMÄ (Rutin-7-glucosid)	344 (100)	562 (48) 736 -	A+H+Glu A+H+Rut	954	-

Die Intensitäten bei Isorhamnetin-3-rhamno-7-glucosid-PMÄ sind gerade umgekehrt, nämlich 42% für den A+H+Glucose-Peak gegenüber einem 1.4%igen A+H+Rhamnose-Peak. Die gleichen Relationen wurden beim Vergleich von Isorhamnetin-3-gluco-7-arabinosid-PMÄ (54,55) mit seinem 3-Arabino-7-glucosid-Iso-meren gefunden. Auch weitere Beispiele von Diglykosiden bestätigen die Regel, daß die Anwesenheit eines intensiven A+H+Monosaccharid-Peaks ein Indiz dafür ist, daß der Zucker dieses Monoglykosid-Bausteins in 7-Position gebunden sein muß (Tabelle 3, S. 20).

Diese Regel ist besonders für die Strukturanalyse von Diglykosiden mit mehreren Zuckereinheiten an verschiedenen phenolischen OH-Gruppen brauchbar.

Bisher wurden die Bindungsverhältnisse durch selektive bzw. partielle, saure oder enzymatische Hydrolyse ermittelt (56,57). Die Hydrolysegeschwindigkeit, die von der Natur des Zuckers und seiner Position am Aglykon abhängt, wurde zeitlich verfolgt. Nachteilig ist - abgesehen vom großen Zeitaufwand - daß die Ergebnisse oft nicht eindeutig genug sind. Man benötigt außerdem Enzympräparate mit hoher Substratspezifität. Die Massenspektroskopie liefert demgegenüber in kürzester Zeit und im Mikromaßstab eine verlässliche Unterscheidung.

Natürlich gelten diese Regeln auch für Bisglykoside in engerem Sinn, d.h. Diglykoside mit gleichen Zuckeranteilen. Da alle natürlich vorkommenden Quercetin-bis-glucoside (52,58) synthetisiert zur Verfügung standen, konnten wir anhand der Intensitäten der M^+ -Peaks und der Monoglucosidfragmente zwischen diesen differenzieren.

Weitere Gewißheit bringt ein Vergleich der Massenspektren von PDM-Glykosiden (II) mit ihren PM-Derivaten (I).

Noch einfacher ist es, das underivatisierte Glykosid (III) aufzunehmen und den Aglukon-Peak und die RDA-Fragmente des "unsauberen" Massenspektrums mit denselben des permethylier-ten Produktes (I) zu vergleichen (Abb. 9, S. 22).

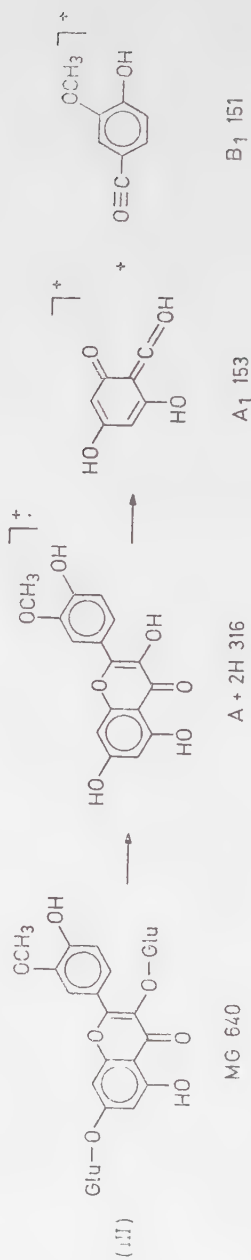
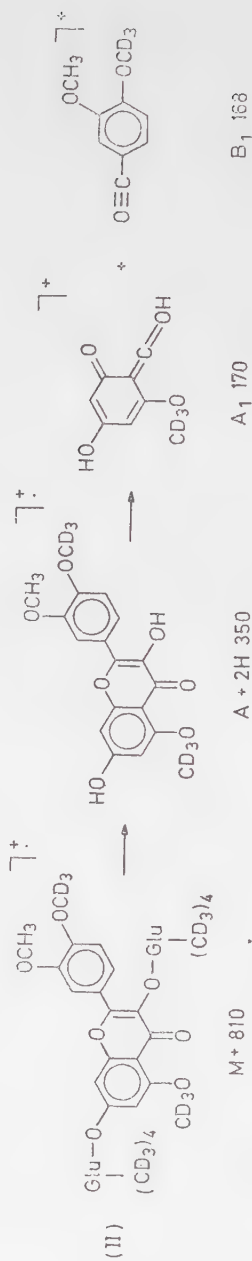
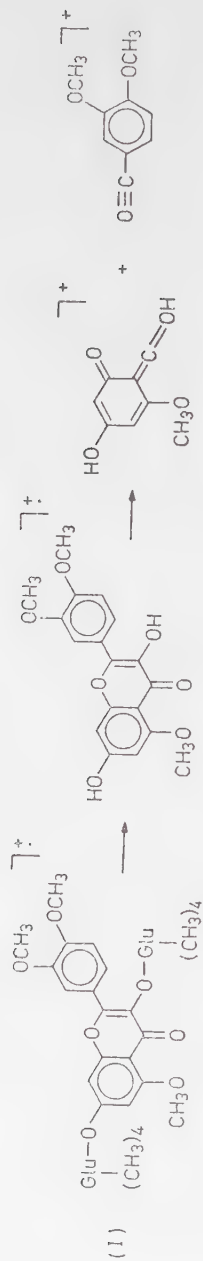


Abb. 9

Isorhamnetin-3,7-bisglucosid (III)
PM- und PDM-Derivate (I) u. (II)

2.4 PM-Flavon-monoside

PM-Flavon-7-glykoside ergaben M^+ -Peaks von ca. 50% Intensität relativ zum A+H-Peak, Flavon-5- und 2'-glucoside dagegen schwache M^+ -Peaks unter 1%. Für M-32 und A+H-15-Fragmente gilt das unter 2.1 Gesagte.

RDA-Fragmente waren oft nicht mit Sicherheit festzustellen (Tabelle 4, S. 24).

2.5 PM-Flavon-bioside und -diglykoside

Die Massenspektren von 7 Flavon-7-biosiden zeigten - ähnlich wie bei den Flavonolen - charakteristische Unterschiede zwischen $1 \rightarrow 6$ und $1 \rightarrow 2$ verknüpften Disaccharideinheiten (19). So ist die Unterscheidung zwischen Rutinosiden und Neohesperidosiden aufgrund von A+H, A+S' und T+S-Fragmenten möglich (Tabelle 5, S. 25, Abb. 10 u. 11, S. 24a).

$1 \rightarrow 6$	$1 \rightarrow 2$
A+H	A+2H
A+S+H	A+S+2H
A+S+60	T+S+H
T+S	T+S-32

Die Molekülionen weisen Intensitäten von ca. 10% auf.

Apiose als terminaler Zucker im PM-Apiin ist an den Fragmenten m/e 174, 143, 129, 111, 101, 85 zu erkennen.

Die geringen A+2H-Massen kennzeichnen Flavon-diglykoside.

Es ist wiederum anzunehmen, daß der 7-O-Zucker im Monosid-Bruchstück 516 mu mit verstärkter Intensität enthalten ist.

T a b e l l e 4
Flavon-monoside m/e (rel.Int.%)

	A+H	A ₁	B ₁	M ⁺
Apigenin-7-galaktosid-PMÄ (Thalictin)	298 (100)	-	132 (62)	516 (50)
Apigenin-7-glucosid-PMÄ (Cosmosiin)	298 (100)	-	132 (48)	516 (42)
Echioidinin-2'-glucosid-PMÄ (Echioidin)	298 (100)	-	-	516 (0.3)
Luteolin-7-glucosid-PMÄ	328 (100)	-	162 (12)	546 (59)
Luteolin-5-glucosid-PMÄ (Galuteolin)	328 (100)	167 (12)	162 (10)	546 (0.1)
Jaceosidin-7-glucosid-PMÄ (Jaceosid)	358 (100) 345 (60) A+H-15	181 (13)	-	576 (45)
Chrysin-7-glucuronid-ME-PMÄ	268 (100)	-	-	500 (35) 468 (48) M-32
Apigenin-7-glucuronid-ME-PMÄ	298 (100)	-	-	530 (52) 498 (42) M-32
Chrysoeriol-7-glucuronid-ME-PMÄ	328 (100)	-	-	560 (45) 528 (40) M-32

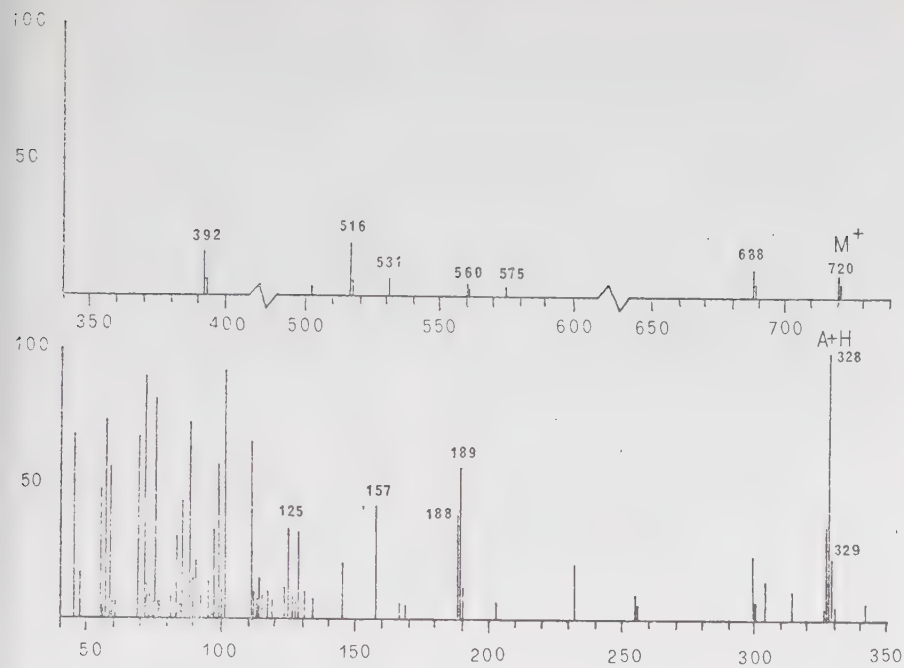


Abb. 10

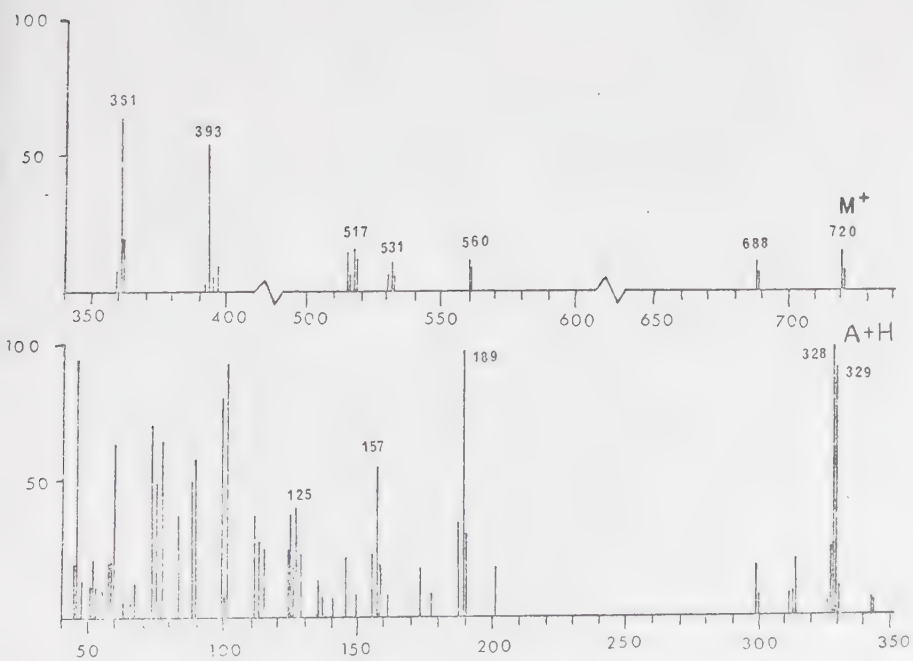


Abb. 11

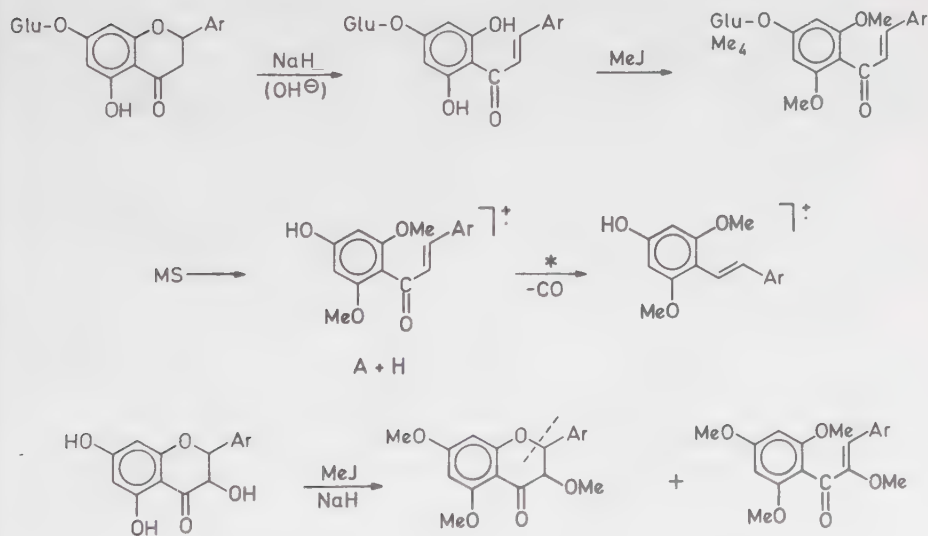
T a b e l l e 5

Flavon-bioside und -diglykoside m/e (rel. Int.%)

	A+H A+2H	A+S'+H A+S'+2H	A+S'+16 A+S'+60	T+S(-H) T+S-32	T	S	M ⁺ M-32
Apigenin-7-(2-0-apiosyl)-glucosid-PMÄ (Apin)	298 (100) 299 (90)	472 (8) 457 (5)	501 (3) 539 (18)	379 (9) 347 (31)	174 (24)	204 (50)	676 (5) 644 (4)
Apigenin-7-neohesperidosid-PMÄ (Rhoifolin)	298 (100) 299 (75)	487 (8)	501 (2) 530 (3)	392 (49) 361 (14)	189 (180)		690 8(9) 658 (6)
Acacetin-7-neohesperidosid-PMÄ (Fortunellin)	298 (100) 299 (76)	487 (10)	501 (2) 530 (3)	393 (30) 361 (106)	189 (350)		690 (7) 658 (5)
Acacetin-7-rutinosid-PMÄ (Linarin)	298 (100) 299 (24)	486 (15)	501 (3) 530 (3)	392 (12)	189 (145)		690 (10) 658 (7)
Iuteolin-7-neohesperidosid-PMÄ (Veronicaströs)	328 (100) 329 (95)	517 (15)	531 (9) 560 (12)	393 (48) 361 (65)	189 (96)		720 (13) 688 (8)
Luteolin-7-rutinosid-PMÄ (Scolymosid)	328 (100) 329 (21)	516 (16)	531 (5) 560 (3) 575 (3)	392 (14)	189 (50)		720 (8) 688 (11)
Diosmetin-7-rutinosid-PMÄ (Disomin)	328 (100) 329 (28)	516 (12)	531 (8) 560 (7) 575 (3)	392 (8)	189 (82)		720 (12) 688 (8)
Apigenin-7-,4-di-glucuronid-ME-PNÄ	284 (100)	516 (49) 484 (54)	-MeOH	-	201 (160)		748 (2) 716 (1) -MeOH

2.6 PM-Flavanon-monoside, -bioside und -bisglykoside

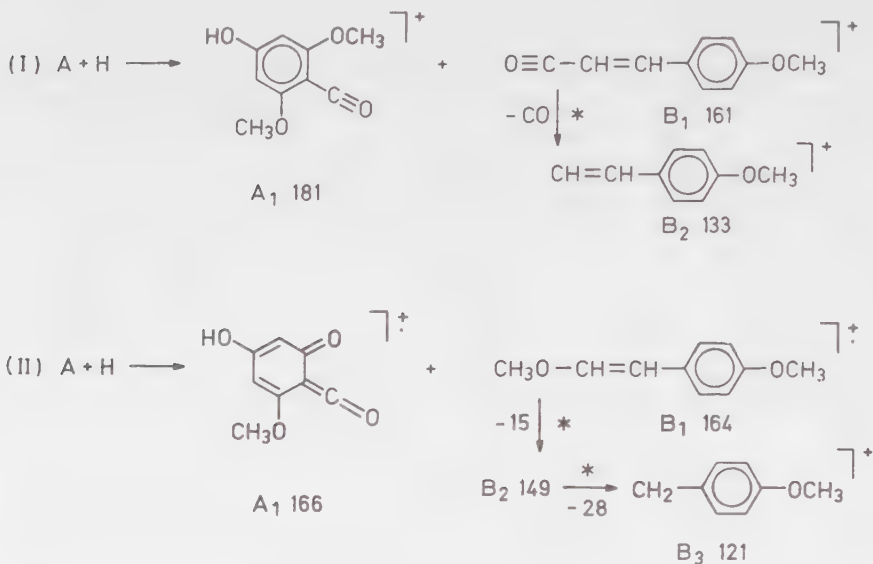
Flavanon-glykoside erleiden im alkalischen Milieu der BRIMACOMBE-Permethylierung Ringöffnung zu 2'-Hydroxy-chalkonen und werden als solche methyliert. Daraus resultieren um 14 ME höhere Molekül- und Aglukon-Peaks, als man sie für ein Flavanon errechnet. SCHMID (19) hat dies fälschlicherweise auf eine C-Methylierung zurückgeführt. Flavanon-3-ole ergeben unter den gleichen Permethylierungsbedingungen nur teilweise unter Ringöffnung die 2', α -Dimethoxy-chalkonderivate. Deshalb liegen diese im Gemisch mit den PM-Flavanon-olen vor.



Charakteristisch für permethylierte Chalkonglykoside ist der A+H-28-Peak, der durch Eliminierung von CO zum Stilben-Derivat (infolge Arylumlagerung) entsteht. Dies wurde von uns am perdeuteriomethylierten Aglykon studiert und durch das Auftreten von metastabilen Ionen belegt.

Aglykon-Bruchstücke treten als Benzoyl-Ionen aus dem A-Ring und Cinnamoyl- sowie Äthylenphenol-Fragmente aus dem B-Ring

auf (59.60). Flavanonole fragmentieren dagegen über die Methoxyäthylenphenol-Ionen zu Benzyl-Ionen aus dem B-Ring (4,61).



O-Prenylverbindungen, wie z.B. Selinon-7-glucosid-PMÄ manifestieren sich durch einen $A+H+69$ -Peak und ein intensives m/e 69-Bruchstück.

Die Intensitäten der M^+ -Peaks von 7-Glucosiden lagen bei unseren Messungen bei etwa 15% (Tabelle 6, S. 28), die von Flavanon-7-rhamno-glucosiden bei ca. 8%. Diese Bioside ergeben wieder charakteristische Monosid- und Disaccharid-Fragmente, wobei sich Rutinoside von isomeren Neohesperidosiden durch die $A+H$, $T+S$ und $A+S'$ -Peaks unterscheiden. Die 5,7-Bisglykoside der PM-Flavanon-Chalkon-Reihe zeigten M^+ -Peaks von ca. 3% und Monosid-Fragmente von ca. 30% Int. (Tabelle 7, S. 28).

T a b e l l e 6 : Flavanon-monoside m/e (rel.Int.%)

	A+H A+H-28	A ₁	B ₁	B ₂	M ⁺
Dihydrowogonin-7-glucosid-PMÄ	314 (100) 286 (21)	211 (18)	131 (32)	103 (35)	532 (15)
Isosakuranetin-7-glucosid-PMÄ (Isosakuranin)	314 (100) 286 (35)	181 (31)	161 (42)	133 (24)	532 (18)
Eriodictyol-7-glucosid-PMÄ	344 (100) 316 (39)	181 (48)	191 (30)	164 (31)	562 (17)
Homoeriodictyol-7-glucosid-PMÄ	344 (100) 316 (38)	181 (36)	191 (31)	164 (16)	562 (13)

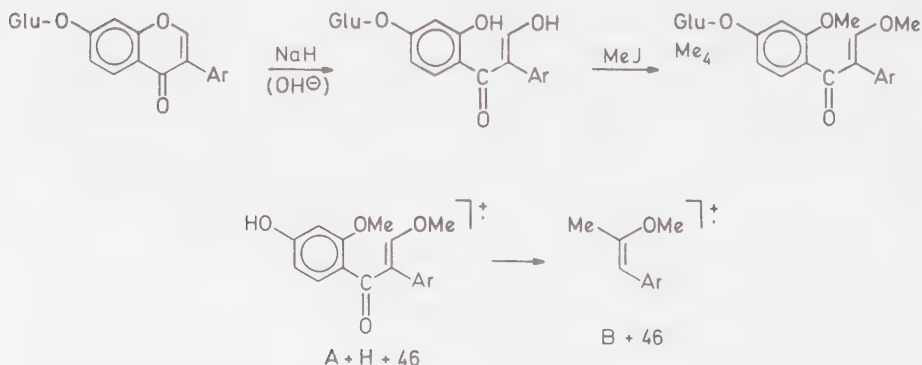
T a b e l l e 7 : Flavanon-bioside und -diglykoside m/e (rel.Int.%)

	A+H A+2H A+H-28	A+S'+H A+S'+2H	T+S(-H) T+S-32	T	M
Naringenin-7-neohesperidosid-PMÄ (Naringin)	314 (100) 315 (135) 286 (124)	503 (5)	393 (92) 361 (280)	189 (200)	706 (5)
Isosakuranetin-7-rutinosid-PMÄ (Neoponcirin, Acinosid)	314 (100) 315 (14) 286 (60)	502 (14)	392 (31)	189 (600)	706 (8)
Eriodictyol-7-neohesperidosid-PMÄ (Neeriocitrin)	344 (100) 345 (81) 316 (70)	533 (4)	393 (81) 361 (320)	189 (800)	736 (7)
Hesperetin-7-rutinosid-PMÄ (Hesperidin)	344 (100) 345 (20) 316 (52)	532 (10)	392 (12)	189 (310)	736 (8)
Eriodictyol-5,7-diglucosid-PMÄ	330 (100) 301 (43)	548 (30)	-	218 (140)	766 (3)

2.7 PM-Isoflavon-monoside und -bioside

Isoflavon-7-monosid-PMÄ ergaben Massenspektren mit ausgeprägten M^+ -Peaks von 80% und mehr rel.Int. (Tabelle 8, S. 30). Teilweise zeigten sie einen $M+46$ -Peak, sowie einen Aglucon-Peak der Masse $A+H+46$. Durch Permethylierung von Isoflavon-Aglyka wurde ermittelt, daß auch hier in vielen Fällen ein Nebenprodukt der Molekülmasse $M+46$ entsteht. Diese Nebenreaktion tritt bevorzugt bei 5-Desoxy-isoflavonen auf, die offenbar sehr alkalieempfindlich sind (62,63). Nach Deuteromethylierung entstehen $M+52$, sowie $A+H+52$ -Peaks. Wir nehmen an, daß durch teilweise Ringöffnung im alkalischen Milieu enolische Desoxybenzoinderivate entstehen (64), deren freie OH-Gruppen gleichzeitig methyliert werden, so daß eine OCH_3 und eine CH_3 -Gruppe zusätzlich in das Molekül eingeführt werden. Diese regelmäßig auftretenden zusätzlichen Peaks stammen also nicht - wie SCHMID (19) vermutet - von einer Verunreinigung der Isoflavonoid-Ausgangsverbindung.

Da RDA-Fragmente in der Isoflavonreihe von denen der Flavone nicht zu unterscheiden sind, kann man durch die beschriebene Nebenreaktion differenzieren. Diese ist wahrscheinlich auch verantwortlich zu machen für $B+46$ -Fragmente, die zusammen mit den typischen RDA-Fragmenten auftreten.



T a b l e 8 : Isoflavon-monoside m/e (rel.Int.%)

	A+H A+H+46	A ₁ A ₁ +14	B B+46	T	M M+46
Formononetin-7-glucosid-PMÄ (Ononin)	268 (100) 314 (96)	136 - 151 (49)	132 (53) 178 (210)	218 (87)	486 (115) 532 (104)
Pseudobaptigenin-7-glucosid-PMÄ	282 (100) 328 (185)	136 - 151 (62)	146 (20) 192 (260)	218 (124)	500 (80) 546 (93)
Texasin-7-glucosid-PMÄ	298 (100) 344 (160)	166 (12) 181 -	132 (30) 178 (340) 164 (72)	218 (285)	516 (86) 562 (110)
Genistein-7-glucosid-PMÄ (Genistin)	298 (100) 344 (2)	166 (22) 181 -	132 (15) 178 (21)	218 (112)	516 (85) 562 -
Genistein-4'-glucosid-PMÄ (Sophoricosid)	298 (100) 344 (8)	181 (14) 195 (7)	118 - 164 (33)	218 (75)	516 (8) 562 (2)
Iridin-7-glucosid-PMÄ (Iridin)	388 (100) 434 (5)	197 (19) 211 (6)	192 (5) 238 (48)	218 (82)	606 (78) 652 (2)

T a b l e 9: Isoflavon-bioside m/e (rel.Int.%)

	A+H A+H+46	A+S' (+H) A+S'+2H	(+46)	T+S (-H) T+S (-32)	T	M M+46
Formononetin-7-cellobiosid-PMÄ	268 (100) 314 (125)	501 (6) 532 (15)	422 (10) 395 (7)	218 (91)	690 (15) 736 (14)	
Pseudobaptigenin-7-cellobiosid-PMÄ	282 (100) 328 (168)	515 (14)	422 (7)	218 (115)	704 (10) 750 (17)	
Pseudobaptigenin-7-rutinosid-PMÄ (Pseudobaptisin)	282 (100) 328 (170)	470 (11) 516 (32)	392 (5)	189 (210)	674 (12) 720 (25)	
Calycosin-7-neohesperidosid-PMÄ	298 (100) 344 (148)	533 (27) 487 (18)	393 (34) 361 (56)	189 (128)	690 (8) 736 (15)	

Aufgrund von Trideuteromethylierung und Hochauflösungsdaten können diese Fragmente wie oben angegeben formuliert werden. Vermutlich werden sie im Verlaufe einer Umlagerung gebildet. Die Bioside haben M^+ -Peaks von ca. 10% Intensität (Tabelle 9, S.30). Ihre Fragmentierung entspricht den bisherigen Regeln.

2.8 PM-Flavonoid-acylglykoside

Bei der MS-Untersuchung einiger Acylglykoside fanden wir, daß unter den angegebenen Bedingungen der HAKOMORI- und BRIMACOMBE-Methylierung Acetylgruppen glatt hydrolysiert werden. So kann man z.B. Peracetate von Polyphenolglykosiden direkt permethylieren, wobei die Acetylreste durch Methylreste ersetzt werden. Größere Acylreste, wie p-Cumaroyl-, Feruloyl-, Galloyl- oder α -Methylbutyryl-Gruppen bleiben jedoch bei der BRIMACOMBE-Methode als Ester intakt. Wir erhielten stets Acylzucker-Bruchstücke von hoher Intensität. Der Base-Peak war in allen Fällen der Acylrest (Tabelle 10, S. 33).

Beim Linarin-methylbutyrat, einem Flavon-acylrutinosid konnten wir durch MS des Permethylprodukts die Bindung des Säurerestes an die endständige Rhamnose nachweisen (65). Besteht nach dem IR-Spektrum Verdacht auf Acetylzucker, so sollte man zusätzlich nach KUHN und TRISCHMANN (27) permethylieren, um das erhaltene Massenspektrum zu analysieren. Bei diesem Verfahren bleiben in der Kälte auch Acetat-Bindungen erhalten und können am zugehörigen Zucker identifiziert werden (66).

Als Beispiele sollen hier die MS permethylierter Flavon-, Flavonol- und Flavanon-acylglykoside diskutiert werden.

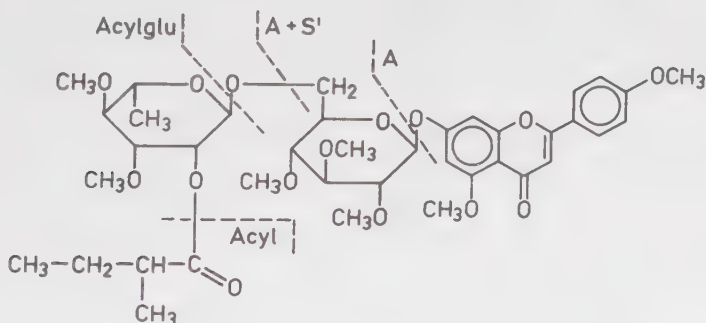
Pruningallat-PMÄ ergibt einen A+H-Peak von 314 mu, begleitet von A+2H und A+H-28-Peaks. Ein intensiver Doppelpeak bei 398/399 mit anschließender MeOH-Abspaltung addiert sich mit dem Aglucon-Peak zum Molekül-Ion bei 712 mu.

Somit muß es sich hierbei um den Acylzucker handeln. Der Acylrest (mit CO-Abspaltung) stellt den Base-Peak bei 195 mu.

Als Differenz zum M^+ -Peak zeigt sich ein M-Acyl-Fragment bei 517 mu. Ferner tritt der Zuckerrest T bei 187 und 155 ME auf.

Tilirosid-PMÄ hat einen M^+ -Peak von äußerst geringer Intensität. Die Acyl- und Acylglucose-Einheiten liefern die intensivsten Ionen bei 161 und 364 mu. Diese Werte sind mit einem Glucoserest, der mit p-Cumarsäure verestert ist, in Einklang zu bringen.

Linarin-methylbutyrat-PMÄ ergibt Acylfragmente bei 85 (Base-Peak) und 57 ME. Der Acylzucker bei 258 mu zeigt zusammen mit dem Zuckerrest m/e 157, daß es sich um eine acetylierte Rhamnose handeln muß, d.h. daß der terminale Zucker verestert ist. Anstelle des Rutinosyl-Restes bei m/e 392 erkennt man den Acylrutinosyl-Rest bei 462 mu. A+S'-Bruchstücke treten wie beim PM-Linarin auf.



Die Stelle der Acylbindung am Monosaccharid geht aus dieser Fragmentierung nicht hervor. Außerdem ist Acylwanderung zwischen vicinalen O-Positionen häufig anzutreffen (67,68).

Flavonoid-acylglycoside m/e (rel. Int. %)

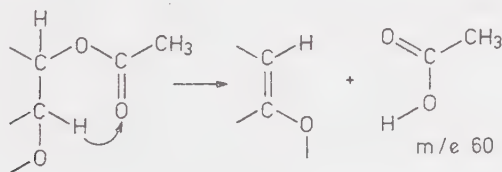
	A+H A+2H	M	Acyl Acyl-28	Acyl- zucker	M-Acyl	T-Rest
Naringenin-7-(6"-galloyl)- glucosid-PMÄ (Pruningallat)	314 (100) 315 (40)	712 (36)	195 (1000) 167 (320)	398 (120) 399 (128)	517 (12)	187 (92) 155 (115)
Kämpferol-3-(6"-p-cumaroyl)- glucosid-PMÄ (Tilirosid)	328 (100)	692 (0.1)	161 (125) 133 (55)	364 (20)	530 (2)	203 (28) 187 155
Acacetin-7-(2"-α-methyl- butyryl)-rutosid-PMÄ (Linarin-methylbutyrat)	298 (100) 299 (78)	760 (5) 728 (7) M-MeOH	85 (185) 57 (92)	259 (160) 227 (54) 462 (4) Acylrutin	501 (6) 531 (10) 556 (11)	157 (87) 125 (55)

3. Peracetate

Bei der massenspektroskopischen Glykosid-Analyse ist es von Vorteil, mehrere Derivate heranzuziehen. Es werden dadurch Befunde über die Struktur zusätzlich gesichert. Wir haben deshalb geprüft, inwieweit die Massenspektren der im Mikromaßstab leicht zu gewinnenden Peracetate ebenfalls Rückschlüsse auf die Strukturen der untersuchten Flavonoide erlauben. Die Acetylierung erfolgte mit Pyridin-Acetanhydrid bei Raumtemperatur. Die Spektren zeigten, daß die Acetate gut geeignet sind, die Zuckeranteile sowie den Aglykon-Typ abzuleiten oder zu bestätigen. Da die Abspaltung von Keten (17) aus dem A+H-Radikalion die phenolisch gebundenen Acetylgruppen anzeigt, ergibt sich hieraus gleichzeitig die Zahl der Hydroxylgruppen am Aglykon. Dies kann zur Sicherung von Methoxysubstituenten im Molekül von Bedeutung sein und eine Deuteromethylierung erübrigen. Die A+H(-n·Ac)-Peaks gehören zu den intensivsten in den Massenspektren.

Die Unterscheidung glykosidisch gebundener Hexosen, Pentosen und Methylpentosen war ähnlich wie bei den Permethyläthern auf Grund charakteristischer Sequenzen möglich.

Das Verhalten der peracetylierten Pentosen und Hexosen im EI-MS ist eingehend untersucht worden (69-74). Die Abspaltung von Essigsäure aus dem Molekül über eine McLafferty-Umlagerung erfolgt ähnlich leicht wie die Eliminierung von Methanol aus den Permethyläthern.



Diesem Abbau ist die Ketenabspaltung überlagert, so-
daß die Spektren reicher an Bruchstücken erscheinen
als das bei den Permethylzuckern der Fall ist. Typi-
sche Fragmente aller Polyacetate sind die ME 103 und
145, 43 und 60 (HOAc).

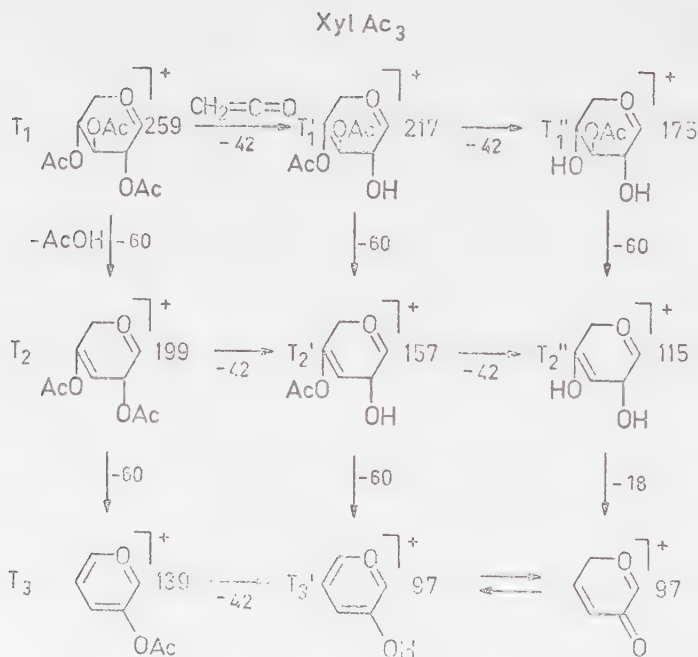
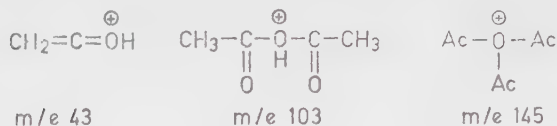


Abb. 12

Fragmentierung des Tri-O-acetyl-xylopyranosyl-Restes

Glu Ac₄

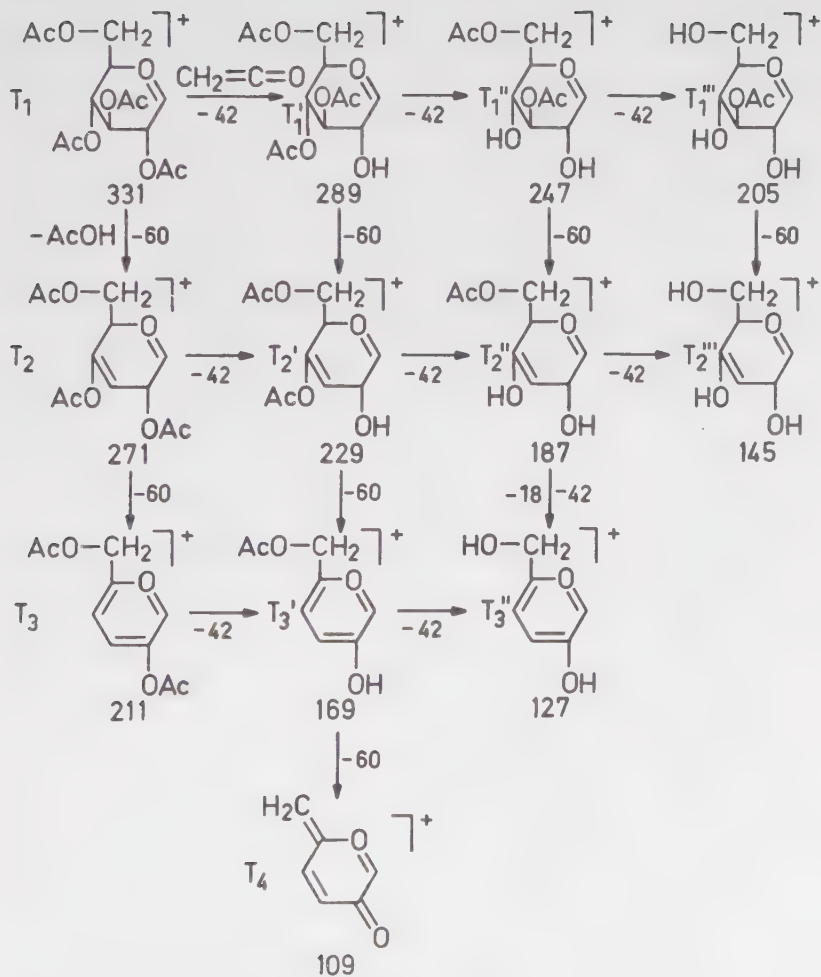


Abb. 13

Fragmentierung des Tetra-O-acetyl-glucopyranosyl-Restes

Nach BIEMANN (70) beginnt der Abbau der Pyranosen bevorzugt am C-3-Substituent der Monosaccharide und entspricht einer abgestuften Reaktivität ihrer sekundären Hydroxygruppen (75,76).

Die jeweils letzten Fragmente der Abbaureihen m/e 97, 109 und 111 erlauben eine sofortige Entscheidung, ob Pentosen, Hexosen oder Methylpentosen vorliegen (Abb. 12, S. 35, Abb. 13, S. 36, Abb. 14).

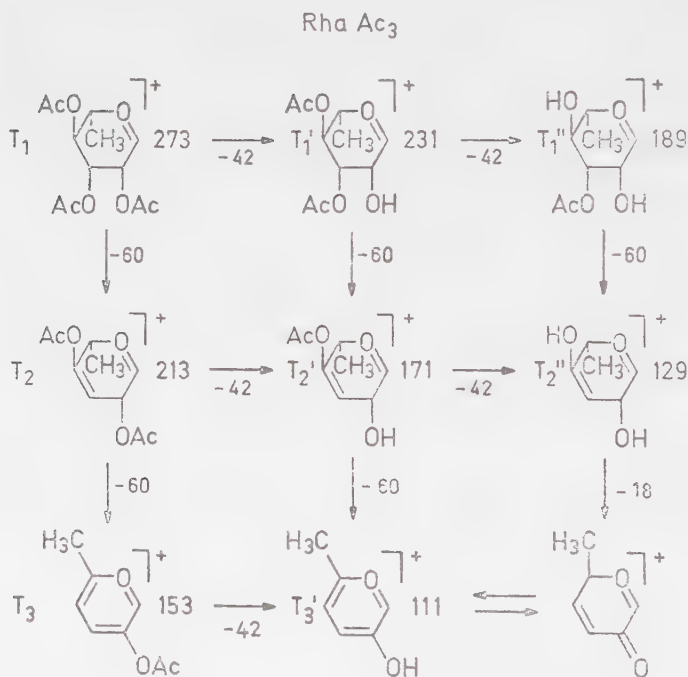


Abb. 14

Fragmentierung des Tri-O-acetyl-rhamnopyranosyl-Restes

Glucuronide bilden bei der Acetylierung mit NaOAc/Ac₂O die Glucopyranuronido- γ -laktone-2,4-diacetate (77). Nach Abspaltung des phenolischen Teils resultieren im MS intensive Glykosylreste der Masse m/e 243 (Abb. 15).

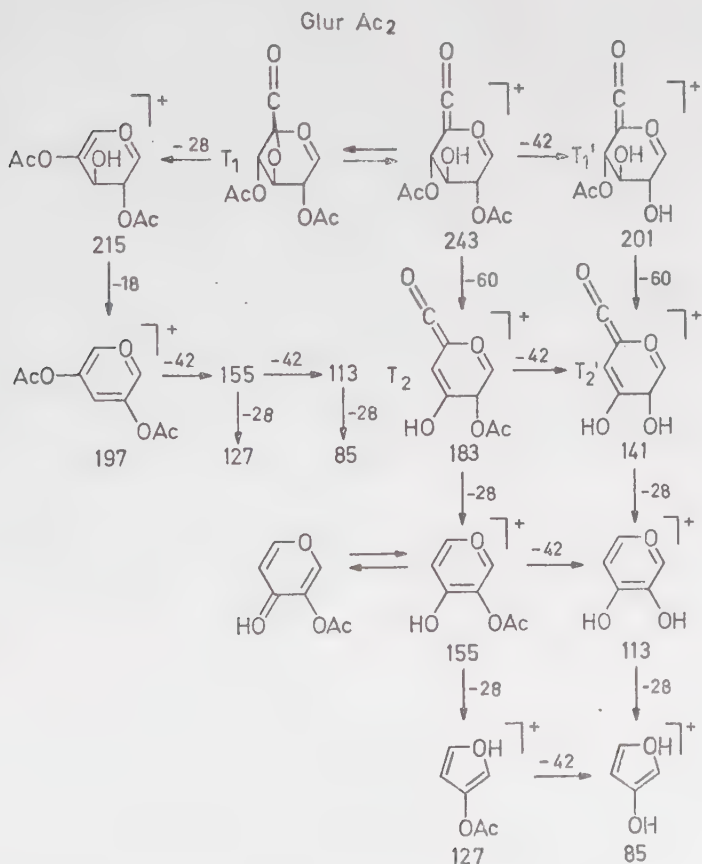
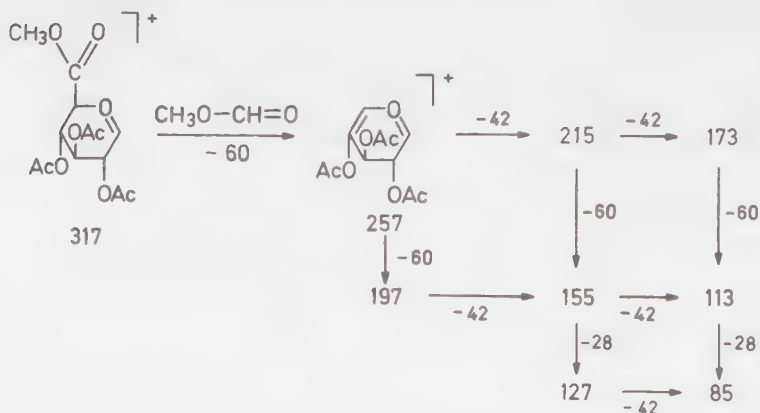


Abb. 15

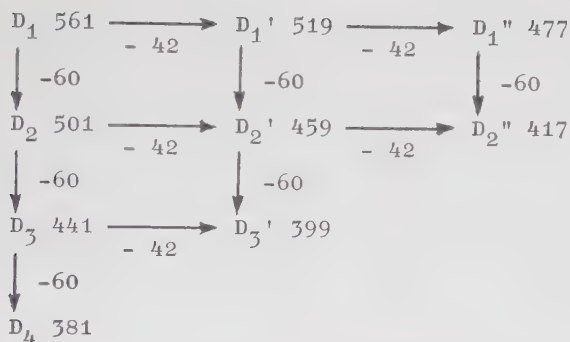
Fragmentierung des Di-O-acetyl-glucopyranuronido- γ -laktone-Restes

Diese T-Zuckereinheiten verlieren neben Essigsäure und Keten auch CO und unterscheiden sich dadurch von den furanoiden Glucuronsäure-lakton-acetaten, welche keine CO-Abspaltung zeigen.

Flavonoid-glucuronide können beim Isolierungsprozeß als Methyl-ester anfallen (78,79). In diesem Falle wird nach erfolgter Acetylierung der T-Zucker als intensives Fragment der MZ 317 erkennbar. Von diesem Glykosylrest (und ebenso vom Molekülion) wird die Methoxycarbonyl-Gruppe mit oder ohne Protonenübertragung abgespalten. Die weitere Fragmentierung verläuft ähnlich wie sie im letzten Schema formuliert wurde.



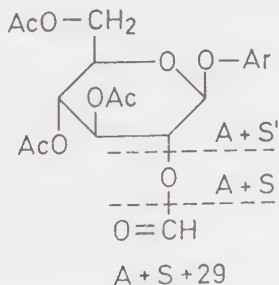
Neben den Monosaccharidbestandteilen der PA-Glykoside sind auch die Disaccharidanteile (D-Fragmente) in den Spektren, wie bereits beschrieben, gut ausgeprägt (80-84). Die Rhamnoglucosyl-Reste von Rutinosiden und Neohesperidosiden ergeben beispielsweise folgende Fragmentreihen, wobei nur D₁ größere Intensität aufweist.



Ebenso zeigen sich die Abbau-Sequenzen der Sekundärzucker am Aromaten (S-Fragmente) deutlicher als bei den Permethylderivaten. Sie beginnen mit den ME 287, 271 oder 229 und folgen dem Schema für Tetra-O-acetyl-glucosylreste.

Molekülpeaks von PA-Monosiden erscheinen durchwegs relativ schwach und geben deshalb weniger gute Unterscheidungsmöglichkeiten für die jeweiligen Zuckerpositionen (Abb. 16, S.41). Das gleiche gilt für Bioside und Bisglykoside. Die M^+ -Peaks sind jedoch begleitet von intensiveren Signalen, die aus wiederholter Ketenabspaltung im phenolischen Molekülteil resultieren.

A+S und A+S'-Peaks sind von sehr geringer Intensität; A+S+29-Peaks konnten jedoch bei Rhamnoglykosiden gut identifiziert werden (Abb. 17 und 18, S. 42).



RDA-Peaks der Hydroxy-Aglyka-Fragmente können kaum zur Strukturermittlung herangezogen werden.

Neben den geschilderten Vor- und Nachteilen gegenüber den PM-Verbindungen sind auch apparative Einschränkungen zu berücksichtigen, da der Nachweis und die Massenbestimmung schwacher Signale bei höheren Massen immer schwieriger werden.

In der folgenden Aufstellung (Tabelle 11 - 14) sind die typischen MS-Daten von 32 Peracetaten verschiedener Flavonoidklassen angegeben. Die aus den einzelnen Moleküleinheiten erhaltenen Schlüsselfragmente M^+ , A+H, T, D, S und A+S mit ihren um 42 bzw. 60 mu verminderten Begleitpeaks ermöglichen eine Charakterisierung der jeweiligen Glykoside.

Molekülpeaks konnten nicht in allen Fällen nachgewiesen werden (Werte in Klammern).

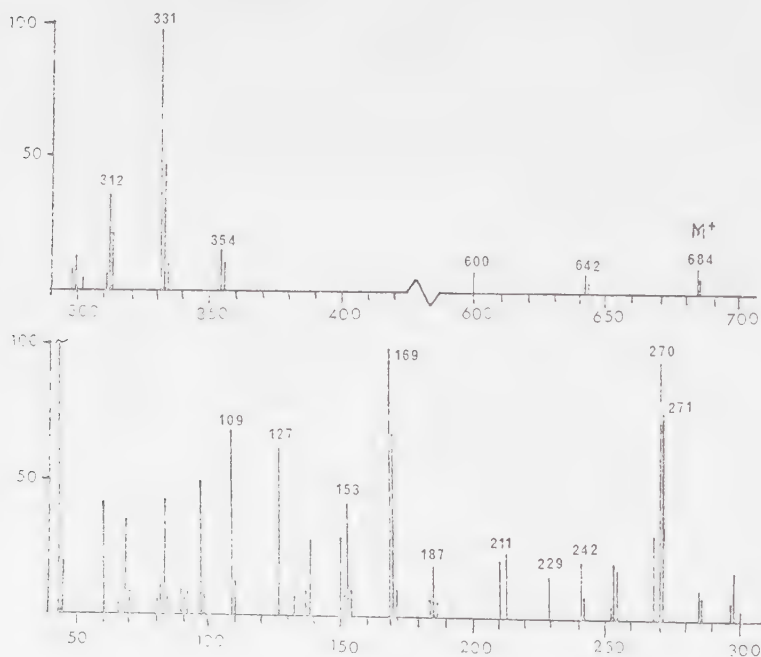


Abb. 16

MS von Apigenin-7-galaktosid-PA

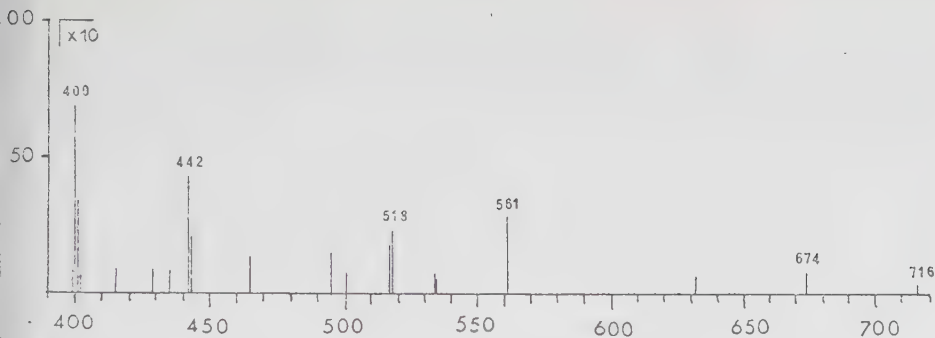


Abb. 17

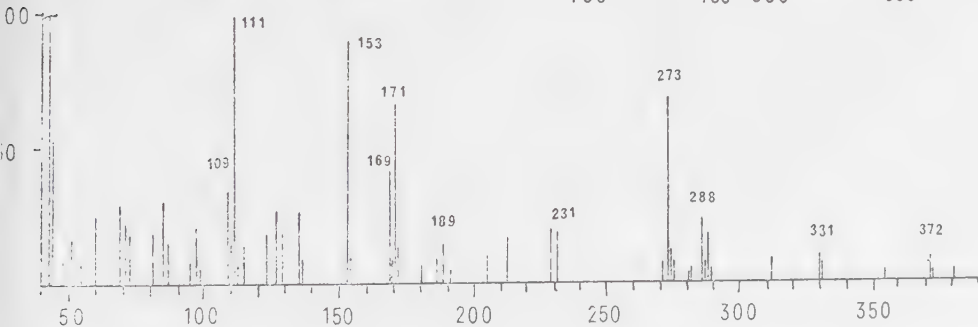
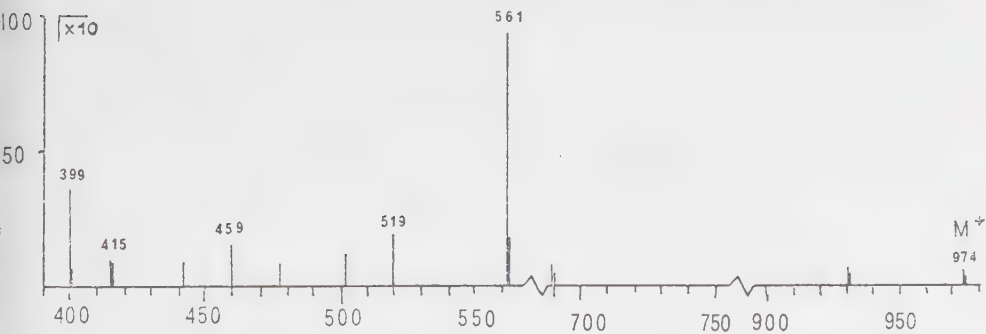


Abb. 18

T a b e l l e 11 : Flavon-glykoside (m/e-Werte)

Apigenin-7-glucosid-PA
(Cosmosiin)

M ⁺	684 - 642 - 600
A+H	354 - 312 - 270 - 241
T	331 - 271 - 229 - 187 - 169 - 139 - 127 - 109

Apigenin-7-galaktosid-PA
(Thalictiin)

M ⁺	684 - 642 - 600
A+H	354 - 312 - 270 - 242 - 153
T	331 - 271 - 229 - 211 - 187 - 169 - 127 - 109

Apigenin-7-glucuronido-γ-lakton-PA

M ⁺	596 - 554 - 512
A+H	354 - 312 - 270 - 242 - 213
T	243, 242 - 201 - 197 - 183 - 169 - 141 - 85

Apigenin-7-(2-O-apiosyl)-glucosid-PA
(Aplin)

M ⁺	900 - 858 - 816
A+H	354 - 312 - 270 - 242
T	259 - 217 - 157 - 139 - 129 - 97
D	547 - 405
S	271 - 229 - 187 - 169 - 127 - 109
A+S	629 - 587

Apigenin-7-neohesperidosid-PA
(Rhoifolin)

M ⁺	914 - 872 - 830
A+H	354 - 312 - 270
T	273 - 213 - 171 - 153 - 111
D	561 - 501
S	271 - 229 - 187 - 169 - 127 - 109
A+S	670 - 628 - 586

Acacetin-7-neohesperidosid-PA
(Fortunellin)

M ⁺	886 - 844
A+H	326 - 284
T	273 - 213 - 171 - 153 - 111
D	561
S	229 - 187 - 169
A+S	642 - 600 - 557

Diosmetin-7-rutinosid-PA
(Diosmin)

M ⁺	944 - 902 - 860
A+H	384 - 343 - 342 - 300
T	273 - 213 - 231 - 153 - 171 - 111
D	561
S	271 - 229 - 169 - 109 - 127
A+S	658

T a b e l l e 12 : Flavonol-glykoside (m/e-Werte)

Centaureidin-7-glucosid-PA
(Centaurein)

M ⁺	774 - 732 - 690 - 648 - 588
A+H	444 - 402 - 360 - 345
T	331 - 271 - 247 - 289 - 211 - 187 - 169 - 145 - 127 - 109

Isorhamnetin-3-galaktosid-PA
(Cacticin)

M ⁺	772 - 730 - 688 - 646
A+H	442 - 400 - 358 - 316
T	331 - 289 - 229 - 187 - 169 - 145 - 139 - 127 - 109

Quercetin-3-glucosid-PA
(Isoquercitrin)

M ⁺	800 - 758 - 716 - 774 - 632
A+H	470 - 428 - 386 - 344 - 302
T	331 - 289 - 271 - 229 - 211 - 187 - 169 - 145 - 127 - 109

Quercetin-3-xylosid-PA
(Reynoutrin)

M ⁺	728 - 686 - 644
A+H	470 - 428 - 386 - 344 - 302
T	259 - 217 - 199 - 157 - 139 - 115 - 97

Quercetin-3-arabinosid-PA
(Guajaverin)

M ⁺	(728)- 686
A+H	470 - 428 - 386 - 344 - 302
T	259 - 217 - 199 - 157 - 139 - 115 - 97

Axillarin-4'-glucuronido- γ -lakton-PA
(Spinatin)

M ⁺	698
A+H	472 - 430 - 388 - 346 - 302
T	243 - 201 - 183 - 155 - 113 - 85

Kämpferol-3,7-dirhamnosid-PA
(Kämpferitrin)

M ⁺	(914)
A+H+Rha	642 - 600 - 558
A+2H	370 - 328 - 286 - 257
T	273 - 231 - 213 - 171 - 153 - 129 - 111

Isorhamnetin-3-glucosyl-7-arabinosid-PA
(Hunnemannosid)

M ⁺	(988)
A+H+Glu	(730)- 688 - 646 - 604
A+H+Ara	658 - 616 - 574 - 532 - 472
A+2H	400 - 358 - 316
Glu	331 - 271 - 229 - 211 - 187 - 169 - 145 - 127 - 109
Ara	259 - 217 - 199 - 157 - 139 - 115 - 97

Quercetin-3-rutinosid-PA
(Rutin)

M ⁺	(1030)
A+H	470 - 428 - 386 - 344 - 302 - 286
T	273 - 231 - 213 - 189 - 171 - 153 - 129 - 111
D	561 - 518
S	271 - 187 - 169 - 127 - 109
A+S	744 - 702

Isorhamnetin-3-rutinosid-PA
(Narcissin)

M ⁺	(1002)
A+H	442 - 400 - 358 - 316 - 301 - 287
T	273 - 231 - 213 - 189 - 171 - 153 - 129 - 111
D	561 - 518, 517 - 501
S	271 - 229 - 187 - 169 - 139 - 127 - 109
A+S	716 - 674 - 632

Rhamnocitrin-3-rhamninosid-PA

M⁺ (1174)

A+H 384 - 342 - 300 - 284

T 273 - 231 - 213 - 171 - 153 - 129 - 111

T+S₂ 503 - 461, 459 - 443 - 401, 399

S 271 - 229 - 187 - 169 - 139 - 147

A+S₁ 613 - 571

Rhamnazin-3-rhamninosid-PA

(Xanthorhamnin C)

M⁺ (1204)

A+H 415, 414 - 372 - 330 - 301

T 273 - 231 - 213 - 171 - 153 - 129 - 111

T+S₂ 503 - 461, 459 - 443 - 401

S 287 - 271 - 229 - 187 - 169 - 139 - 127 - 109

A+S₁ 685 - 643 - 601

Rhamnetin-3-dirhamno-galaktosid-PA

(Xanthorhamnin B)

M⁺ (1232)

A+H 443, 442 - 400 - 358 - 316 - 287 - 259

T 273 - 231 - 213 - 171 - 153 - 129 - 111

T+S₂ 503 - 461

S 287 - 271 - 229 - 187 - 169 - 127 - 109

A+S₁ 713 - 687 - 671 - 645 - 629 - 587

T a b e l l e 13 : Flavanon-glykoside (m/e-Werte)

Dihydrowogonin-7-glucosid-PA

M⁺ 658 - 616 - 556

A+H 328 - 286 - 271

T 331 - 271 - 229 - 211 - 187 - 169 - 145 - 139 - 127 - 109

Eriodictyol-7-glucosid-PA

M⁺ 744 - 702 - 594 - 552 - 492

A+H 415, 414 - 372 - 330 - 288 - 287

T 331 - 289 - 271 - 229 - 211 - 205 - 187 - 169 - 145 - 139 - 127 - 109

Homoeriodictyol-7-glucosid-PA

M⁺ 716 - 674 - 632 - 590

A+H 386 - 344 - 302, 301

T 331 - 289 - 271 - 229 - 211 - 187 - 169 - 145

Isosakuranetin-7-rutinosid-PA
(Acinosid)

M⁺ 888 - 846

A+H 328 - 287, 286, 285 - 257

T 273 - 231 - 213 - 171 - 153 - 111

D 561 - 517 - 501

S 317 - 229 - 187 - 169 - 139 - 109

A+S 644 - 602

Hesperetin-7-rutinosid-PA
(Hesperidin)

M⁺ 946

A+H 386 - 345, 344 - 302, 301

T 273 - 231 - 189 - 171 - 153 - 129 - 111

D 561 - 517 - 501

S 229 - 169 - 145 - 127 - 109

A+S 576

Eriodictyol-7-neohesperidosid-PA
(Neoeriocitrin)

M⁺ 974 - 930

A+H 415, 414 - 373, 372 - 331, 330 - 288, 287

T 273 - 231 - 213 - 189 - 171 - 153 - 129 - 111

D 561 - 519 - 501 - 477 - 459 - 441 - 399 - 281

S 271 - 229 - 205 - 187 - 169 - 127 - 109

A+S 688

T a b e l l e 14 : Isoflavon-glykoside (m/e-Werte)

7-Hydroxy-Isoflavon-7-glucosid-PA	
M ⁺	568 - 508
A+H	239, 238, 237 - 210, 209
T	331 - 289 - 271 - 247 - 229 - 211 - 187 - 169 - 145 - 139 - 127 - 109
Texasin-7-glucosid-PA	
M ⁺	656 - 614 - 554 - 511
A+H	326 - 284, 283 - 269
T	331 - 289 - 271 - 229 - 211 - 187 - 169 - 145 - 127 - 109
Pseudobaptigenin-7-glucosid-PA	
M ⁺	612 - 569
A+H	282 - 251
T	331 - 289 - 271 - 229 - 211 - 187 - 169 - 145 - 139 - 127 - 109
Genistein-4'-glucosid-PA (Sophoricosid)	
M ⁺	682 - 640
A+H	354 - 312 - 270 - 253 - 241
T	331 - 289 - 271 - 229 - 211 - 187 - 169 - 145 - 139 - 127 - 109
7-Hydroxy-Isoflavon-7-cellobiosid-PA	
M ⁺	856
A+H	238, 237
T	331 - 271 - 229 - 211 - 187 - 169 - 127 - 109
D	619 - 559 - 517 - 474
A+S	555
Pseudo-Baptigenin-7-rutinosid-PA (Pseudobaptisin)	
M ⁺	862
A+H	283, 282 - 251
T	273 - 213 - 171 - 153 - 111
D	561 - 501
S	229 - 187 - 169 - 145 - 127 - 109
A+S	598

Auch die PA-Acylglykoside geben charakteristische Abbaufolgen, wie man am Beispiel des Pruningallat-PA nachweisen kann. Aus dem Acylzucker werden einerseits die Acetylgruppen der Gallussäure und andererseits Essigsäuremoleküle aus der Hexose eliminiert (85,86). (Abb. 19)

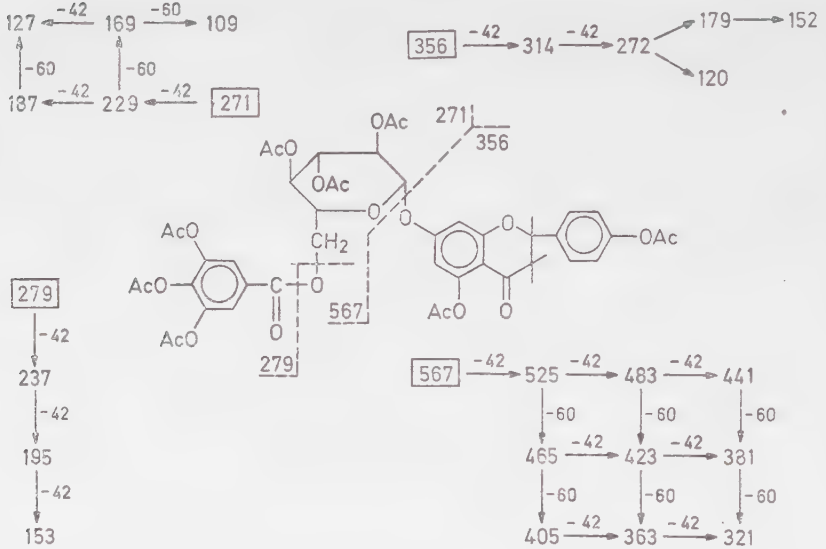


Abb. 19

Fragmentierung von Pruningallat-PA

Wenn Acetylgruppen in Glykosiden genuin vorhanden sind, kann durch Massenspektroskopie der Trifluoracetate (87) das Studium der Fragmentierung erleichtert werden und somit der Acetylzucker lokalisiert werden.

4. Pertrimethylsilyläther

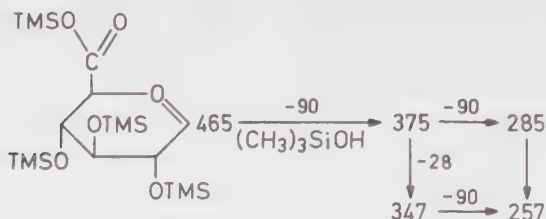
Während die TMS-Äther einfacher Zucker massenspektroskopisch gut bearbeitet worden sind (88), wurden von TMS-Flavonoiden keine MS publiziert. Es sind lediglich massenspektroskopische MG-Bestimmungen einiger Aglyka (89) und Glykoside (18) (z.B. Phloridzin) bekannt geworden.

Die TMS-Derivate von Flavonoid-Glykosiden besitzen naturgemäß Molekulargewichte von 1000 und mehr Masseneinheiten. Trotz ihrer Flüchtigkeit sind sie deswegen schwer zu analysieren, da geeignete Referenzsubstanzen fehlen und Geräte mit hohem Auflösungsvermögen und großer Empfindlichkeit erforderlich sind.

Um die Brauchbarkeit pertrimethylsilylierter Flavonoid-glykoside für die Strukturanalyse zu testen, haben wir die MS von einigen Monoglykosiden mit 6 verschiedenen Zuckeranteilen aufgenommen. Die Silylierung erfolgte in üblicher Weise mit HMDS+TMCS bzw. BSTFA.

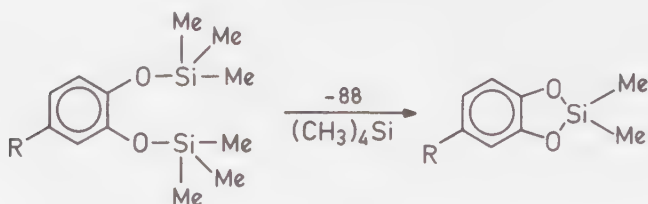
Trimethylsilylgruppen haben die Tendenz, in der Ionenquelle ähnlich leicht zu wandern wie Protonen, so daß neben den A+H-Peaks auch A+TMS-Peaks auftreten. Außerdem sind starke M-15 und A+H-15-Signale zu berücksichtigen. Bei unbekannten Glykosiden kompliziert dies die Auswertung. T-Fragmente der abgespaltenen Zuckerreste sind meist gut zu erkennen. Für endständige Gluco- und Galaktopyranose erhielten wir Fragmente bei 450, 451 und 361 mu, für Rhamnopyranose bei 362, 363 und 273 mu und für Xylo- und Arabinopyranose bei 348, 349 und 259 mu, d.h. die Eliminierung von 1-2 Molekülen Trimethylsilanol (m/e 90) ist zu erkennen, ohne jedoch die bei PM- und PA-Zuckern typischen Sequenzen zu zeigen. Eine Unterscheidung epimerer Hexosen und Pentosen, wie es von den Monosacchariden berichtet wird (90,91), war aufgrund der Massenspektren nicht möglich. (Abb. 20 u. 21, S. 53).

Glucuronsäure als glykosidischer Anteil ist erkennbar durch die T-Peaks bei 465 und 375 mu, gefolgt von CO-Abspaltung.



Da A+H-Peaks geringe Intensitäten aufweisen können, ist von Vorteil, wenn man eine Trideuteromethylsilylierung anschließt (92). Die Massenzunahme analoger Peaks gibt Rückschlüsse auf die Struktur. (Tabelle 15, S. 52).

Abgesehen von diesen Nachteilen ist der besondere Fragmentierungsmechanismus vicinaler TMS-Gruppen am Aromaten für die Analyse von Substitutionstypen aufschlußreich. Bei o-Substitution wird unter Ringschluß Tetramethylsilan abgespalten (93,94, 95). Vorteilhaft sind auch die deutlich auszumachenden Molekülpeaks bei 3-Glykosiden.



Nach Abschluß unserer Arbeiten veröffentlichten SCHELS und Mitarb. (96) die MS von 19 Flavonol-mono-, di- und tri-O-glykosiden, deren TMS-Derivate der EI-MS unterworfen wurden. Durch besondere Kalibrierung der MS-Datenverarbeitung (97) konnten

sie die hohen Massen bestimmen und Molekül-Peaks von 1-8% Int. finden. Außerdem war es möglich, den Spektren strukturspezifische Informationen zu entnehmen.

T a b e l l e 15: Flavon- und Flavonolglykoside (m/e-Werte)

Luteolin-7-glucosid-PTMSÄ	
M ⁺	952 - 937
A+H	502 - 487 - 430 - 414 - 399 - 331 - 319 - 243 - 229
A+TMS	574 - 559 - 471
T	450 - 361 - 271
Isorhamnetin-3-galaktosid-PTMSÄ (Cacticin)	
M ⁺	982 - 967
A+H	532 - 517 - 460 - 445 - 430 - 388 - 373 - 316
A+TMS	604 - 589
T	451, 450 - 361
Quercetin-3-rhamnosid-PTMSÄ (Quercitrin)	
M ⁺	952 - 937
A+H	590 - 575 - 518 - 503 - 487 - 446 - 431 - 415 - 374 - 359 - - 302 -
A+TMS	662 - 647
T	363, 362 - 273
Quercetin-3-arabinosid-PTMSÄ (Guajaverin)	
M ⁺	938 - 923
A+H	590 - 575 - 518 - 503 - 446 - 430 - 415 - 374 - 359 - 302
A+TMS	662 - 647
T	349, 348 - 259
Axillarin-4'-glucuronid-PTMS-Derivat (Spinatin)	
M ⁺	1026 - 1011
A+H	562 - 547
A+TMS	634 - 619 - 531
T	465 - 375 - 347 - 285 - 257
Axillarin-4'-glucuronid-PTDMS-Derivat (Spinatin)	
M ⁺	1089 - 1071
A+H	589 - 571
A+TDMS	670 - 652 - 552
T	500 - 402 - 374 - 360 - 304 - 275

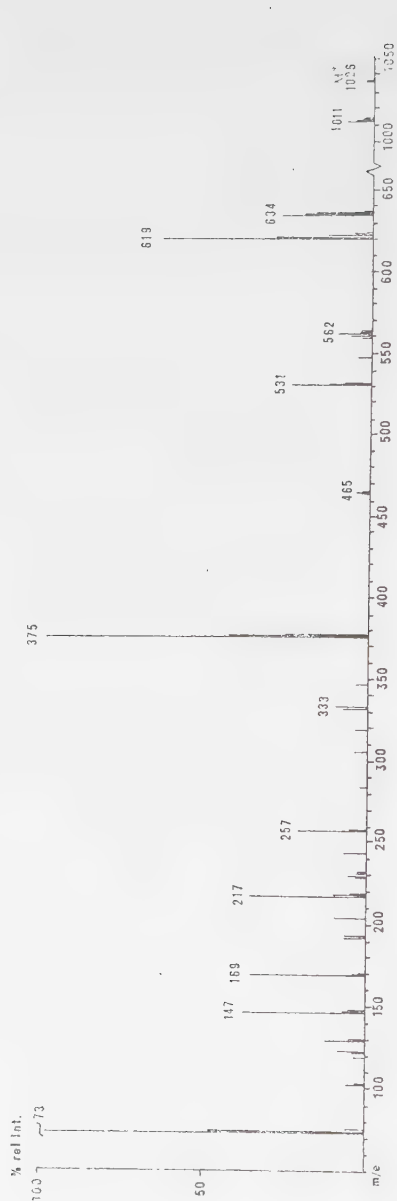


Abb. 20

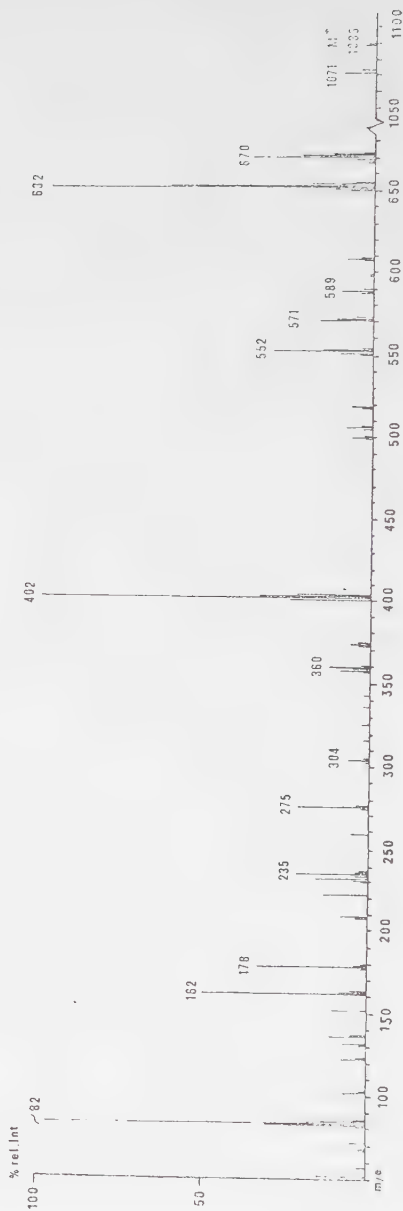
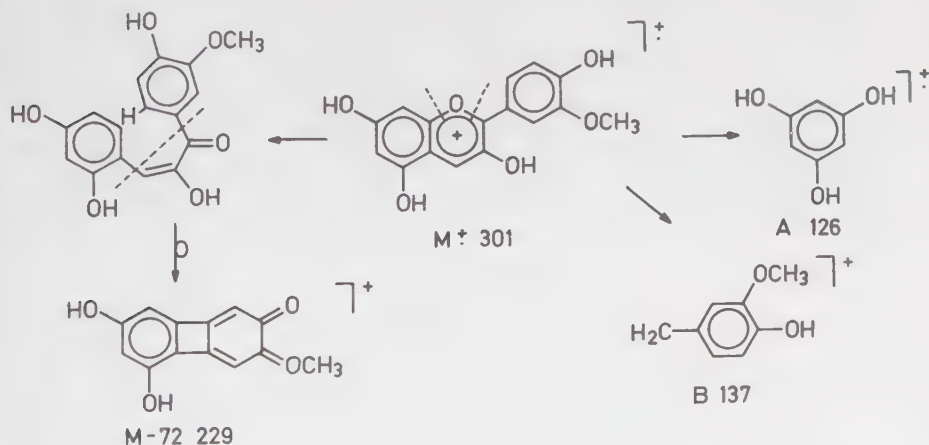


Abb. 21

II. MS von Anthocyaninen

Die Massenspektren der Anthocyanidine Cyanidin, Paeonidin und Malvidin, aufgenommen als Flavylum-chloride, ergaben ungerade Molekül-Peaks von einer dem Base-Peak bei m/e 126 nahekommenden Intensität. Die Moleküle fragmentieren - wie von NILSSON (98,99) für Flavylumverbindungen angegeben - durch Spaltung des C-Ringes, wobei Phloroglucin aus dem A-Ring und Benzylionen des Seitenphenyls auftreten. M-15-Peaks zeigen wie üblich Methoxyl-Substituenten an. Relativ starke M-72-Peaks entstehen durch Umlagerung und anschließende Eliminierung von $\text{CH}_2=\text{O}$ und $\text{CH}_2=\text{C}=\text{O}$ und enthalten A- und B-Ring-Bestandteile.



Genauso zerfallen die schwerflüchtigen, underivatisierten Glykoside. In den MS der Anthocyanine sind neben den Aglykon-Peaks nur noch die Phloroglucin-Bausteine als charakteristische Fragmente zu erkennen. Sie sind deshalb nicht sehr aufschlußreich.

Derivatisierte Anthocyanidine und Anthocyanine wurden bis jetzt nur als TMS-Äther von BOMBARDELLI und Mitarb. (100,101) untersucht. Sie erhielten durch Umwandlung im Gaschromatographen Molekülionen, $A+H^-$ und $A+TMS$ -Peaks in Form der 2-Phenylchinoxalinderivate und daneben Zuckerbestandteile.

Wir versuchten erstmals, Massenspektren von permethylierten Anthocyaninen zu erhalten und kamen beim Studium von 7 Glykosiden zu folgenden Ergebnissen:

Die PM-Anthocyanine zerfallen, wie für O-Glykoside zu erwarten, unter ausgeprägter Zuckerabspaltung, wobei starke A+H bzw. A+2H Aglykon-Peaks resultieren. Die methylierten Aglykon-Fragmente zeigen einen anderen Zerfall als die underivatisierten Anthocyanidine, wie das auch die Spektren der permethylierten Aglyka erkennen lassen. B-Ring-Fragmente waren in allen Spektren signifikant, während A-Ring-Fragmente keine Rückschlüsse auf die Substitution erlauben oder nicht zu erkennen sind (Tabelle 16, S. 58, Abb. 22).

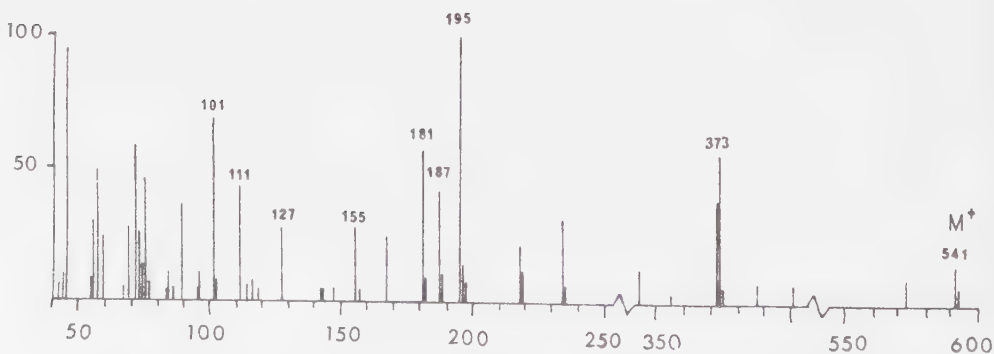
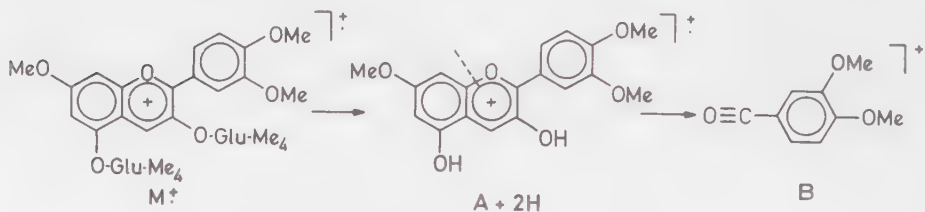


Abb. 22
MS von Malvidin-3-glucosid-PMÄ

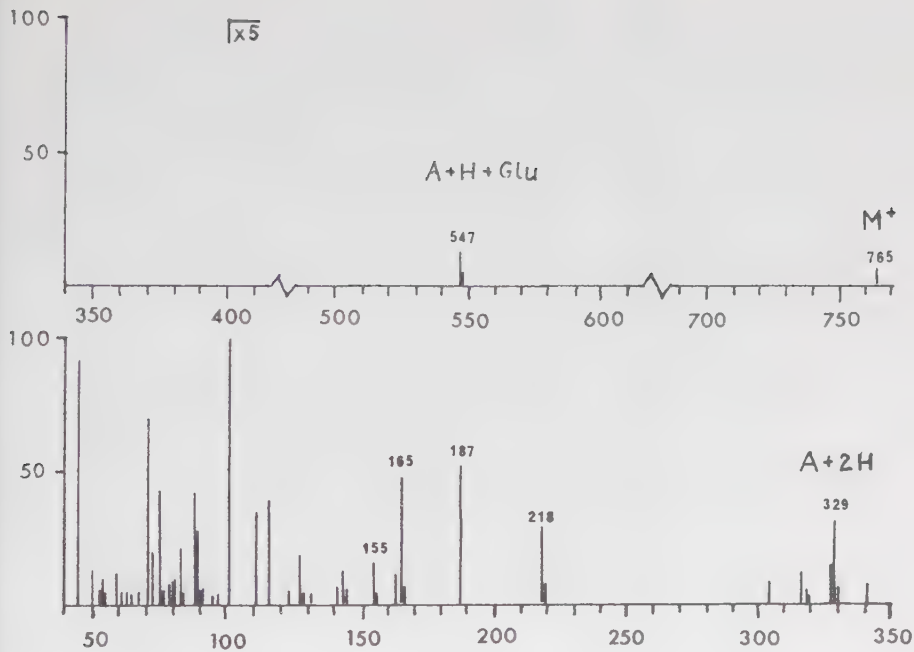
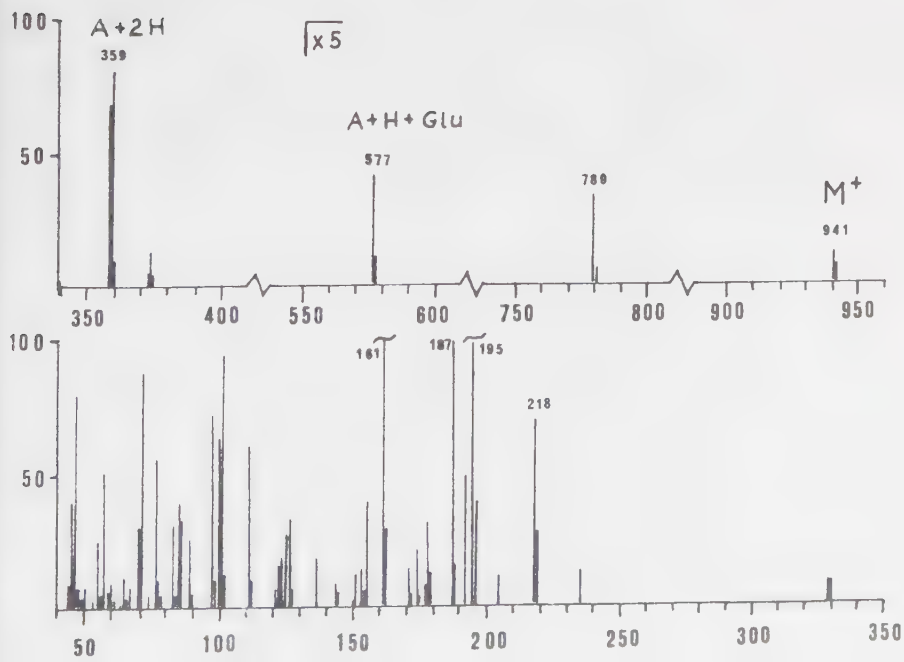
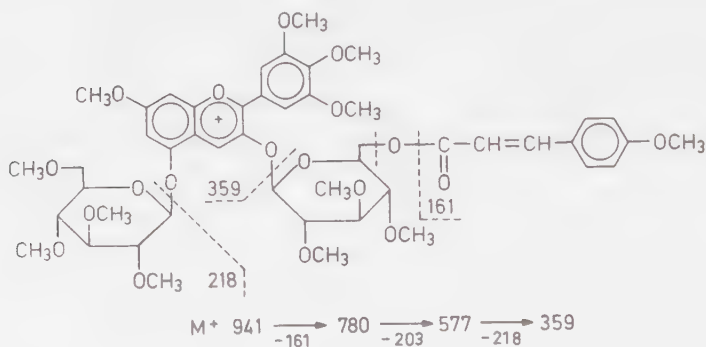


Abb. 23



Aus den deutlich erscheinenden Zuckersequenzen ergeben sich die Monosaccharid-Bausteine. Ungerade Molekülpeaks von 3-Monosiden sind gut auszumachen und haben im Falle von Malvidin-3-glucosid-PMÄ eine Intensität von 10% gegenüber dem A+H-Peak.

3,5-Diglucoside ergeben einen ungeradzahligen Molekülpeak von 3-5% und einen A+H+Glu-Peak von 18-25%. Die Unterscheidung verschiedener Zucker in 3- und 5-Position, bisher durch Hydrolyse praktiziert (41), müßte durch MS möglich sein, da der 3-O-gebundene Zucker offensichtlich leichter abgespalten wird als der 5-O-gebundene. Dies ist an solchen Acyl-Anthocyaninen zu erkennen, deren Acylzucker in 3-Position gebunden sind, wie z.B. Malvidin-3-(6-O-p-cumaroyl-glucosido)-5-glucosid-PMÄ. Hier war neben einem Glu+Acyl-Fragment bei 365 mu ein relativ starker Peak bei m/e 577 erkennbar. Dieser entsprach der Abspaltung des Acylzuckers vom Moleküllion. Ein M-218 oder M-Acyl-218-Peak trat nicht auf. Man muß somit annehmen, daß der 3-O-Zucker bevorzugt fragmentiert, was mit weiteren authentischen Diglykosiden zu beweisen wäre. (Abb.23 u.24, S.56).



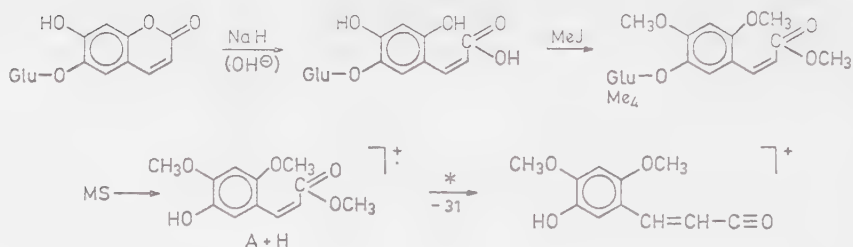
T a b l e 16 : Anthocyanine m/e (rel.Int.%)

	A+H A+2H	A+H+Glu	M M-Acyl	B	T	Acyl
Cyanidin-3-glucosid-PMÁ (Chrysanthemin)	343 (100)	-	561 (8)	165 (210)	218 (46) 187 (92)	
Malvidin-3-glucosid-PMÁ (Oenin)	373 (100)	-	591 (10)	195 (176)	218 (23) 187 (70)	
Cyanidin-3,5-diglucosid-PMÁ (Cyanin)	329 (100)	547 (23)	765 (3)	165 (79)	218 (33) 187 (87)	
Paeonidin-3,5-diglucosid (Paeonin)	329 (100)	547 (18)	765 (5)	165 (192)	218 (93) 187 (160)	
Petunidin-3,5-diglucosid (Petunin)	359 (100)	577 (25)	795 (4)	195 (68)	218 (28) 187 (120)	
Malvidin-3-(6-0-p-cumaroyl- glucosido)-5-glucosid-PMÁ (Malvincumarat)	359 (100)	577 (23)	941 (3) 780 (10)	195 (290)	218 (71) 187 (360)	161 (182)
Petunidin-3-(6-0-p-cumaroyl- glucosido)-5-glucosid-PMÁ (Petunincumarat)	359 (100)	577 (17)	941 (2) 780 (7)	195 (240)	218 (90) 187 (150)	161 (700)

III. MS von Cumarin-O-glykosiden

Die Lage der Doppelbindung im Heterozyklus des Cumarinmoleküls verhindert den Dien-Zerfall. Dafür dominiert bei Hydroxycumarinen die mehrfache CO-Abspaltung. BARNES und OCCOLOWITZ (102), WULFSON und Mitarb. (103), SHAPIRO und DJERASSI (104), DREYER und Mitarb. (105) und andere (106-109) haben die Massenspektren dieser Naturstoffklasse interpretiert.

Wir haben in unserem Arbeitskreis (110) Cumarin-O-glykoside erstmals nach der Natriumhydrid-Methode permethyliert und gefunden, daß sich im alkalischen Medium der heterozyklische Ring zu den entsprechenden o-Hydroxy-Zimtsäuren öffnet und diese zu o-Methoxy-Zimtsäure-methylestern methyliert werden. Ein intensiver A+H-31-Peak ist deshalb in den MS stets zu finden (Abb. 25, S. 60).



Die Peaks der Methylzucker sind deutlich ausgeprägt. Die Position der Zuckerbindung scheint keinen gravierenden Einfluß auf die Spaltung der glykosidischen Bindung auszuüben. Das PM-Cumarinsäure-glucosid von Umckalosid mit paraständiger Glykosidierung zeigte einen M⁺-Peak von 8%. Die Säurederivate von PM-Aesculin und PM-Fraxin mit m-ständiger Glucose ergaben 2%ige bzw. 4%ige Molekülpeaks (Tabelle 17, S. 60).

T a b e l l e 17

Cumarin-0-glucoside m/e (rel.Int.%)

	A+H	A+H-31	M	M-31	T
PM-Fraxinsäure-ME aus Fraxetin-8-glucosid	268 (100)	237 (25)	486 (4)	455 (1)	218 (34)
PM-Aesculinsäure-ME aus Aesculetin-6-0-glucosid	238 (100)	207 (20)	456 (2)	425 (1)	218 (41)
PM-Umckalosidsäure-ME aus Umckalin-7-glucosid	268 (100)	237 (22)	486 (8)	455 (2)	218 (42)

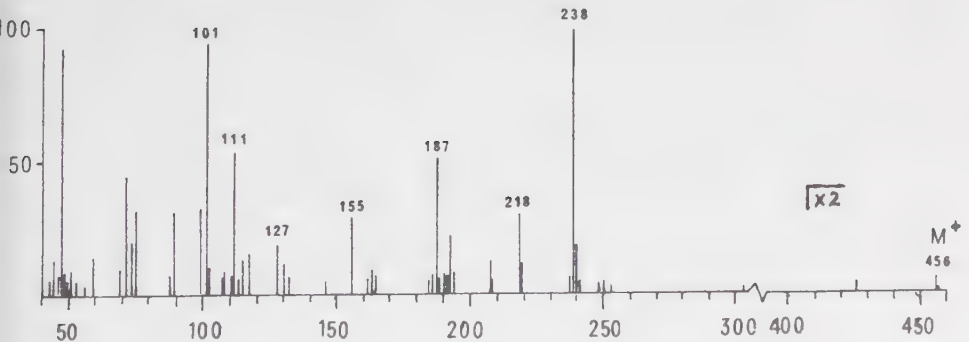


Abb. 25

MS von PM-Aesculinsäure-ME

IV. MS von Xanthon-O-glykosiden

Das Dibenzo- γ -pyron-Ringsystem ist besonders stabil und unterliegt keiner RDA-Spaltung. Die natürlich vorkommenden Hydroxy- und Methoxy-Xanthone ergeben in ihren Massenspektren nach LOCKSLEY und Mitarb. (111-113) und SANTESSON (114) sowie ARENDS und Mitarb. (115) sehr intensive Molekülpeaks und Abspaltungen von CO, CHO, H₂O und CH₃.

Die von uns untersuchten Xanthon-O-glykoside sind in 3-Position glykosidiert. Sie lieferten als Permethyläther ausgeprägte Molekülpeaks von 12 - 30% Int. gegenüber dem A+H-Peak. Neben diesem ist ein A+H-29-Peak hervorstechend (Tabelle 18, S. 62, Abb. 26).

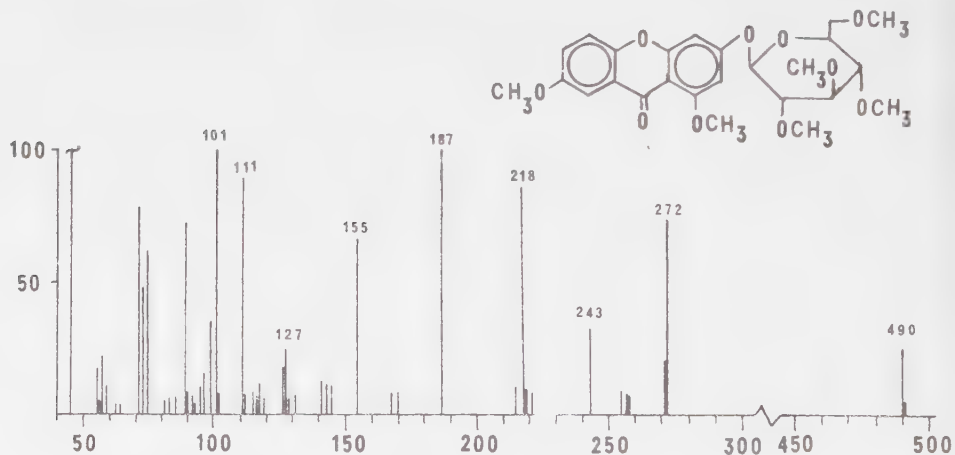


Abb. 26

MS von Isogentisin-3-glucosid-PMÄ

Auch die Peracetate ergaben einen deutlichen Molekülpeak von ca. 1 - 4% (Tabelle 19, S. 62). Somit dürfte auch diese Klasse von Polyphenolglykosiden nach Permethylierung oder Acetylierung der Massenspektroskopie zugänglich sein.

T a b e l l e 18

Xanthon-O-glykoside m/e (rel.Int.%)

	A+H	A+H-29	M	T	D
1,3-Dihydroxy-Xanthon-3-glucosid-PMÄ	242 (100)	213 (36)	460 (12)	218 (85)	
Isogentisin-3-glucosid-PMÄ	272 (100)	243 (41)	490 (30)	218 (112)	
1,3-Dihydroxy-Xanthon-3-cellobiosid-PMÄ	242 (100)	213 (27)	664 (4)	218 (142)	422(6)

T a b e l l e 19: Xanthon-O-glykoside (m/e-Werte)

1,3-Dihydroxy-Xanthon-3-glucosid-PA

M⁺ 600 - 558 - 540

A+H 270 - 228 - 241 - 199

T 331 - 271 - 229 - 211 - 187 - 169 - 145 - 139 - 127 - 109

Isogentisin-3-glucosid-PA

M⁺ 630 - 588

A+H 300 - 258 - 243 - 229 - 211

T 331 - 271 - 229 - 211 - 187 - 169 - 145 - 139 - 127 - 109

1,3-Dihydroxy-Xanthon-3-cellobiosid-PA

M⁺ (888) - 846 - 828

A+H 270 - 228 - 241 - 199

D 619 - 559 - 517 - 474

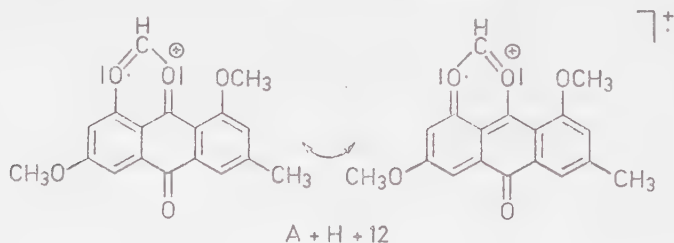
T,S 331 - 271 - 229 - 211 - 187 - 169 - 145 - 139 - 127 - 109

A+S 587

V. MS von Anthrachinon-O-glykosiden

Polyhydroxyanthrachinone zerfallen im Massenspektrometer unter Elektronenstoß sehr monoton durch Abspaltung von CO und H₂O. Grundsätzliche Arbeiten sind von BEYNON und WILLIAMS (116) und anderen Autoren (117) erschienen.

Glykoside müssen wieder derivatisiert werden. Die Zucker sind bei Anthraglykosiden überwiegend in 8- oder 6-Position gebunden. Wir untersuchten mehrere 8-O-Monoside und -Bioside, sowie die 6-O-Glykoside Frangulin A und B und die 6,8-O-Diglykoside Glucofrangulin A und B. Als geeignet erwiesen sich neben den Peracetaten (Tabelle 21, S. 67) wieder die Permethylläther (Tabelle 20, S. 65). Deutlich erscheinen die A+H- und A+2H-Peaks, sowie die Zuckerfragmente. Die PMÄ von 8-O-Glykosiden kann man von den 6-O-Glykosiden dadurch unterscheiden, daß nur die ersteren intensive A+H+12- und A+H+44-Peaks, die letzteren aber einen starken A+H-15-Peak aufweisen. Wir nehmen an, daß die zusätzlichen Massen aus dem Zuckeranteil stammen. Durch Nachbargruppeneffekt könnte sich ein mesomeriestabilisiertes Ringsystem ausbilden, wenn ein Zucker in 8-O (bzw. 1-O) gebunden ist.



Die Molekülpeaks von 6-O-Glykosiden sind um den zwei- bis vierfachen Wert intensiver als die von 8-O-Glykosiden.

Diglykoside von Biosiden zu unterscheiden, ist ohne Schwierigkeiten möglich. So hat Emodin-6,8-bisglucosid einen A+2H-Peak von m/e 284, während Emodin-8-gentiobiosid (118) einen A+H-Peak von 298 ergibt. Außerdem findet man das D-Bruchstück C₁₉H₃₅O₁₀ der Masse 422 nur bei Diglykosiden. Die Monosid-Bruchstücke A+S'=485, A+S'+17=502 und A+S'+60=545 ME treten nur bei Disaccharidanteilen auf und sprechen zusätzlich für eine 1 → 6-Verknüpfung, d.h. Gentiobiose.

Glucofrangulin B, dessen Struktur durch Hydrolyse zu Frangulin B postuliert wurde (119), ergab massenspektroskopisch die Bestätigung für diesen Strukturvorschlag. Der M^+ -Peak bei 720 mu, die T-Fragmentreihen einer Hexose und einer Pentofuranose und der A+2H-Peak von 284 mu beweisen die Diglykosid-Struktur. Nach Abspaltung der Pentose verbleibt ein A+H+Glu-Rest von 502 mu. Der Glucosylrest muß aufgrund der starken A+H+12 und A+H+44-Peaks in 1- oder 8-Position gebunden sein. Der A+H+Api-Rest bei 458 mu wird von einem vergleichsweise intensiven A+H+12+T-Fragment begleitet, die 8-O-Zucker werden also leichter abgespalten.

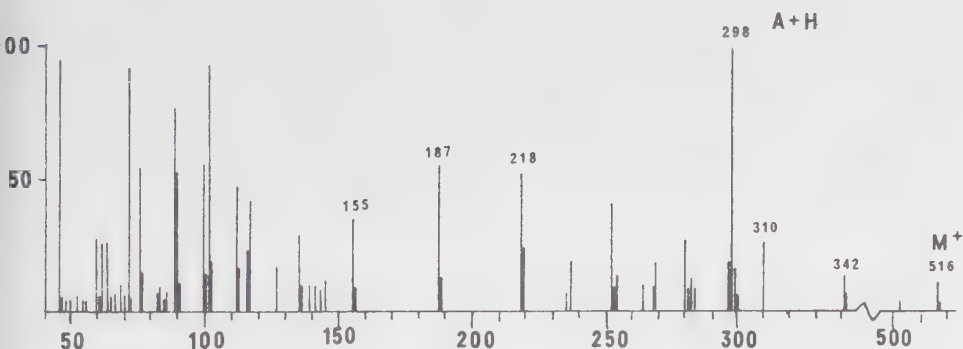


Abb. 27
MS von Emodin-8-glucosid-PMÄ

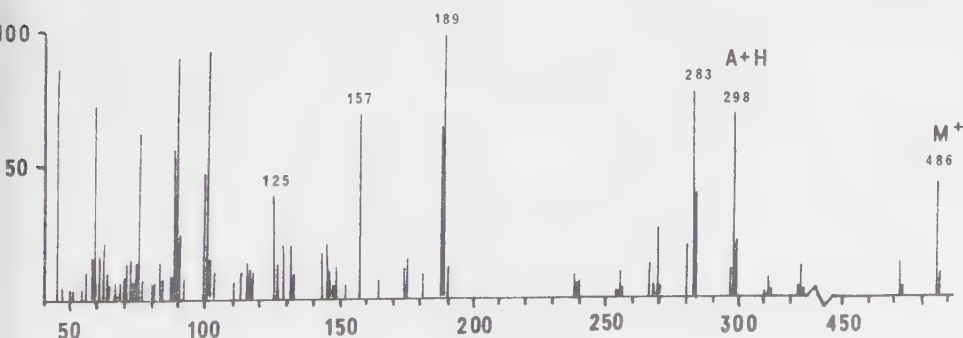
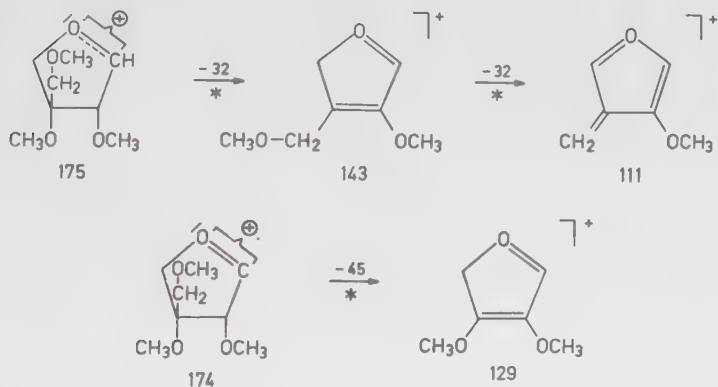


Abb. 28
MS von Emodin-6-rhamnosid-PMÄ

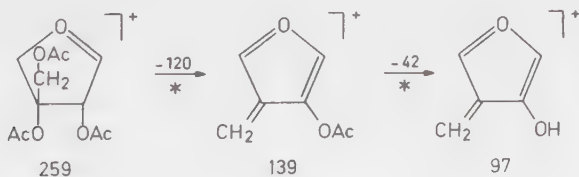
Table 20: Anthrachinon-glykoside m/e (rel. Int. %)

	A+H A+2H	A+H+12 A+H+44 A+H-15	A+H+T(S) A+H+12+T	T	T+S	M
Chrysophanol-8-glucosid- PMÄ	268 (100)	280 (31) 312 (10)		218 (53)		486 (12)
Aloeemodin-8-glucosid-PMÄ	298 (100)	310 (36) 342 (11)		218 (72)		516 (12)
Emodin-8-glucosid-PMÄ	298 (100)	310 (22) 342 (6)		218 (47)		516 (8)
Emodin-6-rhamnosid-PMÄ (Frangulin A)	298 (100)	283 (115)		189 (250)		486 (41)
Emodin-6-apiosid-PMÄ (Frangulin B)	298 (100)	283 (90)		174 (220)		472 (25)
Emodin-8-glucosid-6-rhamnosid- PMÄ (glucofrangulin A)	284 (100)	296 (6) 327 (15)	472 (29) 484 (20) 502 (6)	218 (110) 189 (350)		690 (10)
Emodin-8-glucosid-6-apiosid- PMÄ (glucofrangulin B)	284 (100)	296 (9) 327 (7)	458 (7) 470 (12) 502 (5)	218 (95) 174 (86)		676 (5)
Emodin-8-gentiobiosid-PMÄ	298 (100)	310 (40) 341 (13)	485 (4) 502 (3) 531 (1) 545 (4)	218 (56)	422 (5)	720 (2)

Die verzweigt-kettige Pentose D-Apio-D-furanose im Frangulin B und Glucofrangulin B kann von den Pentopyranosen unterschieden werden, da sie neben der Abspaltung von MeOH aus dem Glykosyl-Kation ein intensives T-45-Bruchstück aus dem Radikalkation liefert (36,40).



Bei den acetylierten Verbindungen ist der Apiofuranoserest an einem sehr intensiven 139 mu Peak neben den anderen Pentosefragmenten zu erkennen (70,120). (Abb. 29 u. 30, S. 68).



Bei den Anthrachinon-di-O-glykosiden konnten keine Molekülpeaks gefunden werden, dafür aber Monosidfragmente, die der Abspaltung einer Glucose, Rhamnose oder Apiose entsprechen. Bemerkenswert für Bioside ist ein relativ starkes Disaccharidfragment.

T a b e l l e 21 : Anthrachinon-O-glykoside (m/e-Werte)

Chrysophanol-8-glucosid-PA

M ⁺	626 - 584
A+H	296 - 254 - 227, 226 - 197
T	331 - 271 - 211 - 169 - 145 - 127 - 109

Aloeemodin-8-glucosid-PA

M ⁺	684 - 642 - 624
A+H	354 - 312 - 270 - 254 - 226, 225 - 197
T	331 - 271 - 211 - 169 - 127 - 109

Emodin-8-glucosid-PA

M ⁺	684 - 642 - 582 - 540 - 498
A+H	354 - 312 - 270 - 241 - 213
T	331 - 271 - 169 - 139 - 109

Emodin-6-rhamnosid-PA
(Frangulin A)

M ⁺	626 - 584 - 542
A+H	354 - 312 - 270 - 241 - 213
T	273 - 213 - 171 - 153 - 129 - 111

Emodin-6-apiosid-PA
(Frangulin B)

M ⁺	612 - 570 - 552
A+H	354 - 312 - 270 - 242, 241 - 213
T	259 - 217 - 199 - 157 - 139 - 129 - 97

Emodin-8-glucosid-6-rhamnosid-PA
(Glucofrangulin A)

M ⁺	(914)
A+2H	312 - 270 - 241 - 213
A+H+Glu	642 - 600
A+H+Rha	584 - 542
Glu	331 - 271 - 211 - 169 - 127 - 109
Rha	273 - 213 - 171 - 129

Emodin-8-gluco-6-apiosid-PA
(Glucofrangulin B)

M⁺ (900)

A+2H 312 - 270 - 241

A+H+Glu 642 - 600

A+H+Api 570 - 528

Glu 331 - 271 - 169 - 127 - 109

Api 259 - 139 - 157 - 97

Emodin-8-gentiobiosid-PA

M⁺ 972 - 930 - 912 - 870 - 852

A+H 354 - 312 - 270 - 242, 241

D 619 - 576 - 559 - 516 - 499 - 457

T, S 331 - 271 - 229 - 211 - 187 - 169 - 145 - 139 - 127 - 109

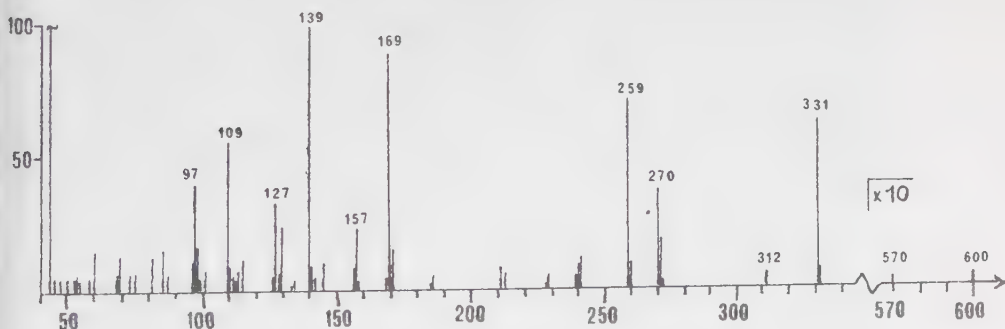


Abb. 29

MS von Emodin-6-rhamno-8-glucosid-PA

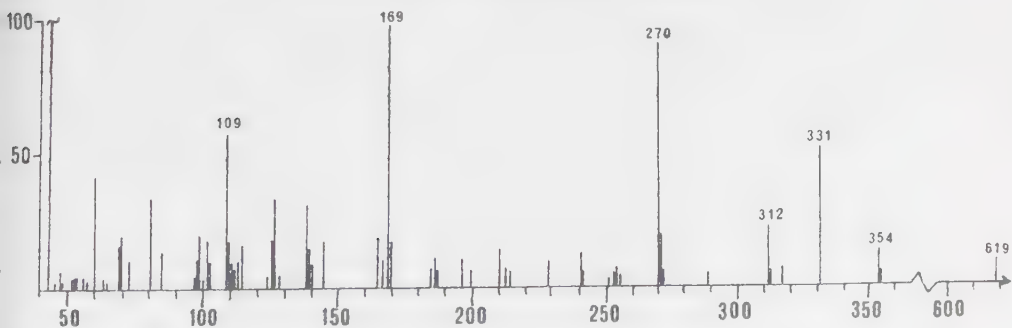


Abb. 30

MS von Emodin-8-gentiobiosid-PA

VI. GC-MS-Zuckerbestimmung in Polyphenolglykosiden durch

Methylierungsanalyse

Digitaloide, Saponine und Glykolipide sind hinsichtlich Art und Sequenz ihrer Zucker durch Methylierungsanalyse vielfach untersucht worden (121-128). Glykoside von Polyhydroxyaromaten, darunter auch Flavonoidglykoside, waren zu Beginn unserer Arbeiten in dieser Hinsicht kaum untersucht (20,21,53,66,129). Wir versuchten deshalb, einen Analysengang auf der Basis von Permethylprodukten auszuarbeiten. Er sollte eine Zuckerbestimmung aus Polyphenolglykosiden im Mikromaßstab durch die GC-MS-Methodik ermöglichen.

Zucker sind als zyklische Halbacetale und Polyalkohole chemisch und thermisch labil. Die Anhäufung polarer Hydroxygruppen bedingt die geringe Flüchtigkeit der Zucker, so daß sie sich underivatisiert für GC und MS nicht eignen. Die EI-Massenspektren sind uncharakteristisch, weil sich thermische und elektronenstoßinduzierte Zerfälle überlagern. Man hat deshalb versucht, Mono- und Disaccharide im Mikromaßstab in flüchtige Derivate zu überführen. Eine kombinierte GC und MS erscheint deshalb besonders geeignet, weil sich Massenspektren von epimeren Zuckerderivaten häufig nur durch geringe Intensitätsabweichungen unterscheiden und die GC-Analytik allein eine Vielzahl teilweise schwer zugänglicher synthetischer Testproben erfordert. Die für GC-MS gebräuchlichen Derivate werden hier kurz aufgeführt:

Bei der Permethylierung von Zuckern erhält man unter Umständen bis zu 4 GC-Peaks der verschiedenen Ring- und anomeren Formen der Methylglykoside, so daß die Identifizierung erschwert ist. Über ihre Massenspektren liegen gründliche Untersuchungen vor (130,131). Besser eignet sich eine Derivatisierung, die unter möglichst schonenden Bedingungen bei pH = 7 und Raumtemperatur verläuft, wie z.B. die Trimethylsilylierung (88,90,132-136). Die MS dieser Derivate werden aber dadurch kompliziert, daß intensive Umlagerungsionen auftreten, die strukturunspezifisch sind. Strukturspezifische Ionen sind dagegen selten und

oft von geringer Intensität. Die peracetylierten Derivate sind präparativ leicht zugänglich und können gaschromatographisch gereinigt werden. Ihre Massenspektren sind ebenfalls gut untersucht worden (37,38,69,70,73,137,138). Sehr leicht flüchtige Derivate erhält man durch die Trifluoracetylierung. Die entsprechenden Verbindungen können bereits bei Säulentemperaturen unter 100° getrennt werden. Die Massenspektren von Trifluoracetaten wurden von KÖNIG (87,139) untersucht. Sie sind analog den Acetatspektren leicht zu deuten. Bekannt ist, daß die Fragmentierung von Alditolderivaten gegenüber den korrespondierenden Zuckern vereinfacht ist. Hierauf gründen BJÖRND AHL und Mitarb. (140-144) ihre Methylierungsanalysen von Polysacchariden, die man auch in der Glykosidanalyse anwenden kann. LAINE und SWEELEY (145,146) haben die Oximierung von Mono- und Disacchariden eingeführt und gute Ergebnisse bei der GC-MS-Analytik erhalten. Es treten zwar syn- und anti-Isomere der Methyloxime auf, doch können sie als solche erkannt werden, da sie als Schultern oder Doppel-Peaks erscheinen. Ein Nachteil ist die ungenügende Trennung verschiedener isomerer TMS-Aldoximmethyläther auf den bisher üblichen stationären Phasen. Die MS-Fragmentierung solcher Zuckerderivate kann in Zweifelsfällen zur Ergänzung der Alditolacetate herangezogen werden. Die O-Isopropyliden-Derivate (Acetonide) dienten De JONGH und BIEMANN (147,148) zur Unterscheidung stereoisomerer Hexosen und Pentosen. Ferner wurden zur GC-MS verwendet: Persilylierte Methylglykoside (149), Aldonitrile (150) und n-Butylboronate (151). Alle erwähnten Zuckerderivate zeigen keine oder nur äußerst schwache Molekülpeaks. Zu den wenigen bisher beschriebenen Derivaten mit ausgeprägten M^{+} -Peaks gehören die Acetate von N-Aryl-glykosylaminen und Phenyl-osotriazolen sowie die der azyklischen Dithioacetale (152,153). Erstere wurden von KOCHETKOV und Mitarb. (83,84,154) zur Sequenzanalyse von Oligosacchariden herangezogen.

Nach Hydrolyse der PM-Glykoside treten anstelle jeder glykosidischen Bindung freie OH-Gruppen. Die erhaltenen Monosaccharide

weisen also stets Hydroxylgruppen am anomeren C auf. Bei Disaccharid- und Oligosaccharidanteilen fallen Monosaccharide mit 2 oder mehr freien OH-Gruppen an. Diese partiell methylierten Monosaccharide haben für die Strukturaufklärung von Zuckerverknüpfungen große Bedeutung. (Methylierungsanalyse). Sie werden für die GC-MS meist am C₁-OH in Glykoside überführt oder reduziert. Besitzen sie darüber hinaus noch mehr als 1 - 2 freie OH-Gruppen, so müssen sie für GC acetyliert oder silyliert werden. Auch die Nachmethylierung mit CD₃J wurde hierfür angewendet (155,156).

Unter Berücksichtigung aller bisher bekannten Methoden kann folgendes festgestellt werden:

1. Zur Identifizierung und Charakterisierung partiell methylierter Zucker ist es wünschenswert, mehrere Derivate herzustellen, um Irrtümer nach Möglichkeit auszuschließen.
2. Die Derivatisierung partiell methylierter Monosaccharide muß im Mikromaßstab präparativ einfach durchzuführen sein.
3. Unter dieser Einschränkung erscheinen die Phenyl-O-glykosid-methyläther und N-Phenylglykosylamin-methyläther durch ihre Molekülpeaks bzw. Glykosylfragmente zur Ermittlung des Molekulargewichts und der Ringstruktur am besten geeignet.
4. O-Methyl-alditolacetate und O-Methyl-methylaldoxim-TMS-äther sind durch ihre Retentionswerte und Fragmentierungsweisen zur Unterscheidung epimerer und strukturisomerer Zucker am besten geeignet.

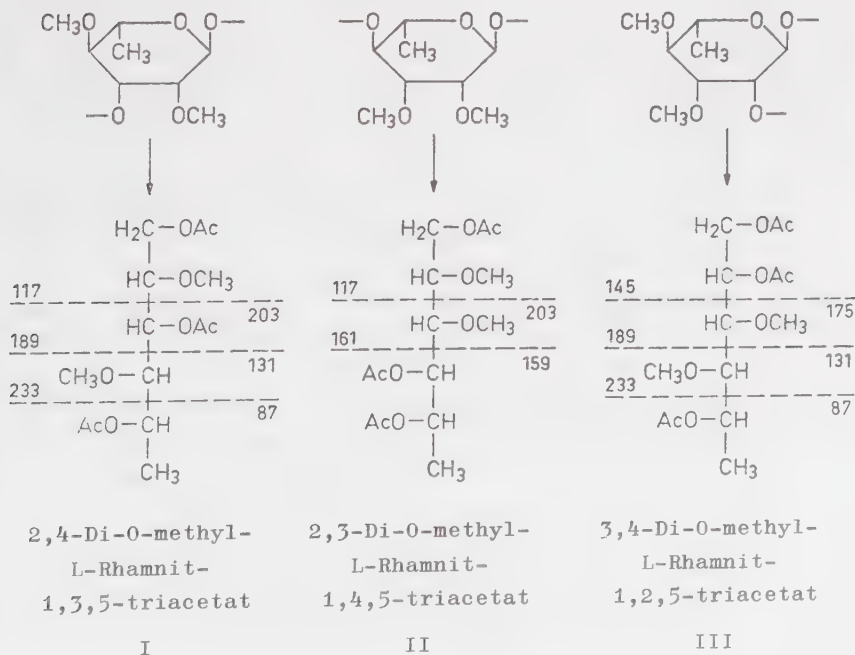
Aufgrund von Vorversuchen konnten wir die Eignung der hier aufgeführten Zuckerderivate für die GC-MS-Analyse der Glykosid-Hydrolysate kritisch beurteilen. Wenn man von 2 - 3 mg Glykosid ausgeht, ist es möglich, nach Permethylierung, Hydrolyse und Abtrennung des Aglykons aliquote Teile des Hydrolysats folgendermaßen weiterzuverarbeiten:

1. Mit Natriumborhydrid reduziert und acetyliert, erhält man die O-Methyl-alditolacetate,
2. nach Oximierung und Silylierung werden die O-Methylaldose-methyloxim-TMS-äther dargestellt,

3. mit Phenol in der Schmelze werden die Phenyl-O-glykosid-methyläther angefertigt und
4. durch Kondensation mit Anilin erhält man die N-Phenyl-glykosylamin-methyläther (Anilide).

1. Alditolacetate

Die GC-MS Identifizierung von partiell methylierten Alditolacetaten nach BJÖRNDAL und Mitarb. (140-144) hat breite Anwendung gefunden, um Zuckerverknüpfungen zu ermitteln. Sowohl die Retentionszeiten als auch die Schlüsselfragmente partiell methylierter Alditolacetate wurden von den schwedischen Autoren tabellarisch zusammengestellt. Die Spaltung zu Primärfragmenten findet bevorzugt zwischen zwei methoxylierten C-Atomen der Zuckerkette statt. Die Fragmentierung zwischen einem methoxylierten und einem acetoxylierten C-Atom erfolgt zweitrangig. Die Unterschiede werden am Beispiel der 3 isomeren Di-O-methyl-rhamnitol-acetate deutlich. (Abb. 31, S.73).



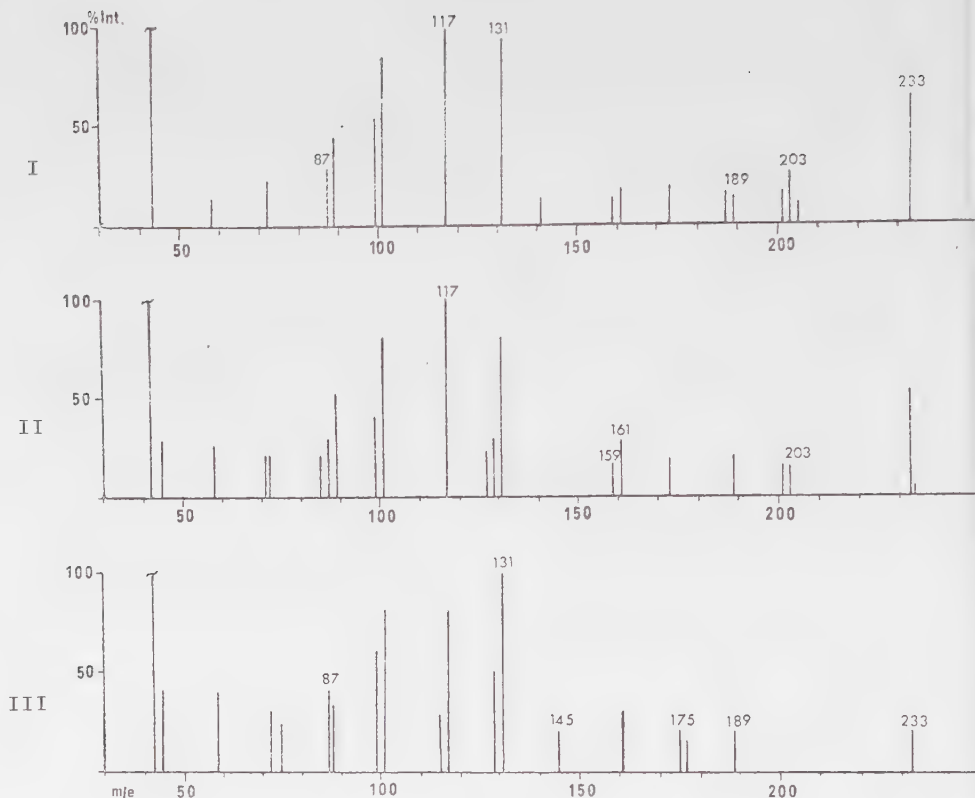


Abb. 31

Um eine Reproduzierbarkeit der GC-Daten zu erreichen, wurden relative Retentionszeiten eingeführt und auf 2,3,4,6-Tetra-O-methyl-glucit-1,5-diacetat R_t Glu = 1 bezogen (Abb. 32, S. 74). Die Massenspektren lassen sich manchmal aus Symmetriegründen nicht zweifelsfrei interpretieren. Bessere Ergebnisse werden dann durch Reduktion mit NaBD_4 erzielt. Auch im Falle von Methyl-glucopyranosid-uronaten, welche hydrolysiert und zu Glucosederivaten reduziert werden, führt die deuterierende Reduktion zu einer Differenzierung gegenüber diesen.

In den bisher erschienenen Arbeiten (20,21,52,53,66,129) über Methylierungsanalysen von Polyphenolglykosiden waren die Alditolacetate Grundlage zur Identifizierung der Zucker. Auf eine eingehende Darstellung kann daher an dieser Stelle verzichtet werden. (Abb. 33,34,35, S. 75).

	t_r [min]	R_t
1) 2,3,4-Tri-O-methyl-L-rhamnit-1,5-diacetat	1.4	0.42
2) 2,3,5-Tri-O-methyl-D-xylit-1,4-diacetat	1.6	0.47
3) 2,3,3'-Tri-O-methyl-D-apiit-1,4-diacetat	1.7	0.5
4) 2,3,4-Tri-O-methyl-L-arabit-1,5-diacetat	2.4	0.71
5) 2,3,4,6-Tetra-O-methyl-D-glucit-1,5-diacetat	3.4	1.0
6) 3,4,6-Tri-O-methyl-D-glucit-1,2,5-triacetat	6.5	1.91
7) 2,3,4-Tri-O-methyl-D-glucit-1,5,6-triacetat	8.4	2.47
8) 2,3,6-Tri-O-methyl-D-glucit-1,4,5-triacetat	8.5	2.50
9) 2,3,4-Tri-O-methyl-D-galaktit-1,5,6-triacetat	11.6	3.41

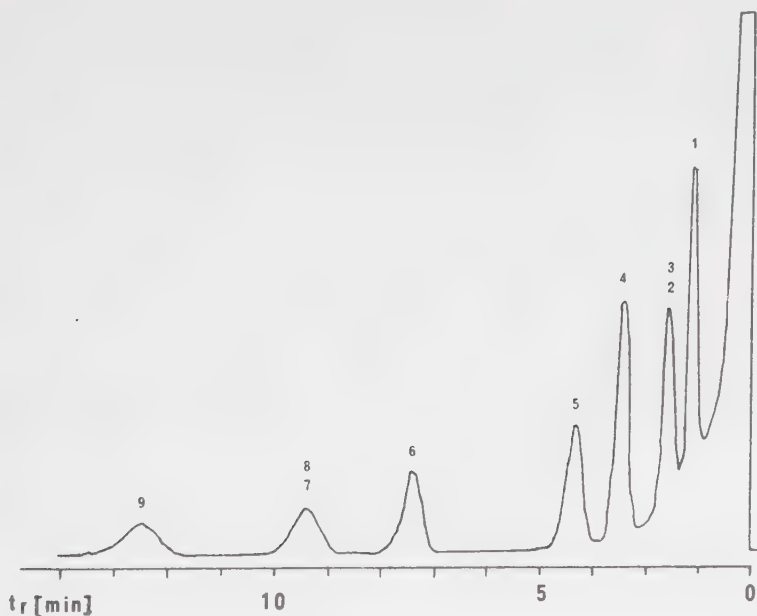


Abb. 32

GC von O-Methyl-Alditolacetaten

(1.4 m, 6x3 mm Glas, 3% ECNSS-M, 168⁰ isoth. 48 ml He/min)

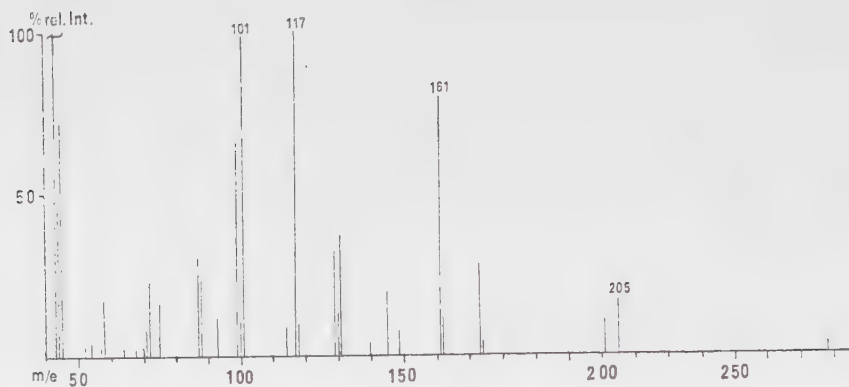


Abb. 33

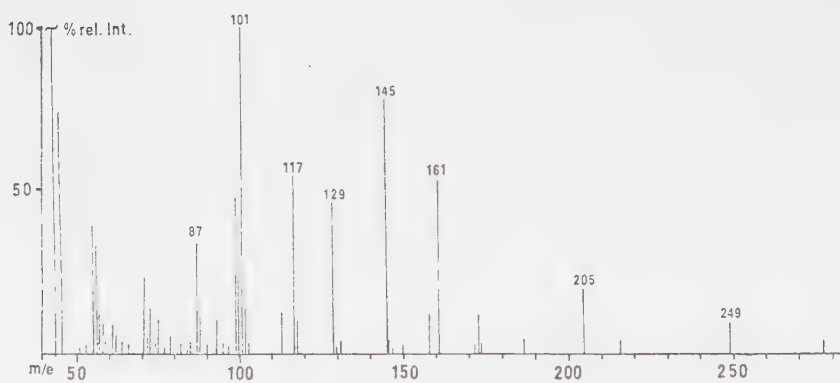


Abb. 34

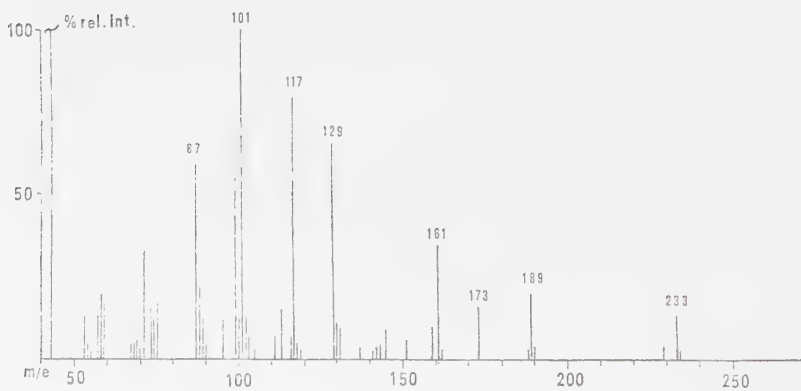
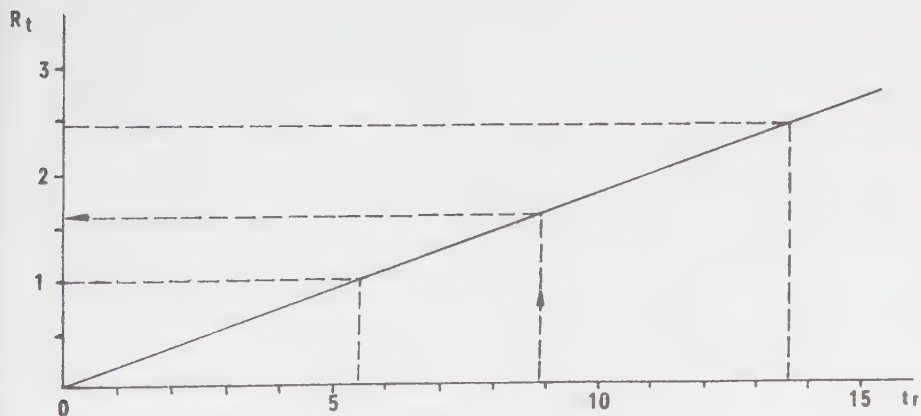


Abb. 35

2. Methylaldoxime

Wie LAINE und SWEeley (145,146) beschrieben haben, besteht die Möglichkeit, durch Oximierung partiell methylierter Zucker O-Methyl-aldose-methyloxim-TMS-äther (MO-TMS-Methylzucker) mit azyklischem, asymmetrischen Aufbau zu erhalten. Die Darstellung der Oxime im Mikromaßstab ist unproblematisch und wurde mit Methoxyammoniumchlorid in Pyridin vorgenommen. Die Trimethylsilylierung erfolgte mit BSTFA. Gegenüber der GC-Trennung auf SE-30 Säulen konnten wir mit einer UCCW-Silicongummiphase von mittlerer Polarität eine Verbesserung erreichen. Syn- und anti-isomere Formen machen sich nur als Schultern oder durch Unsymmetrie der Peaks bemerkbar (Abb.36, S.77).

Als Testgemisch für die GC wurden die Bezugssubstanzen 2,3,4,6-Tetra-O-methyl-5-O-trimethylsilyl-D-glucose-methyloxim $R_{t \text{ Glu}} = 1$ und 3,6-Di-O-methyl-2,4,5-tris-trimethylsilyl-D-glucose-methyloxim $R_{t \text{ Glu}} = 2.47$ zugleich mit der Probe injiziert.



Im Diagramm t_r gegen $R_{t \text{ Glu}}$ lassen sich unbekannte R_t -Werte unabhängig von apparativen Bedingungen mit genügender Sicherheit reproduzieren.

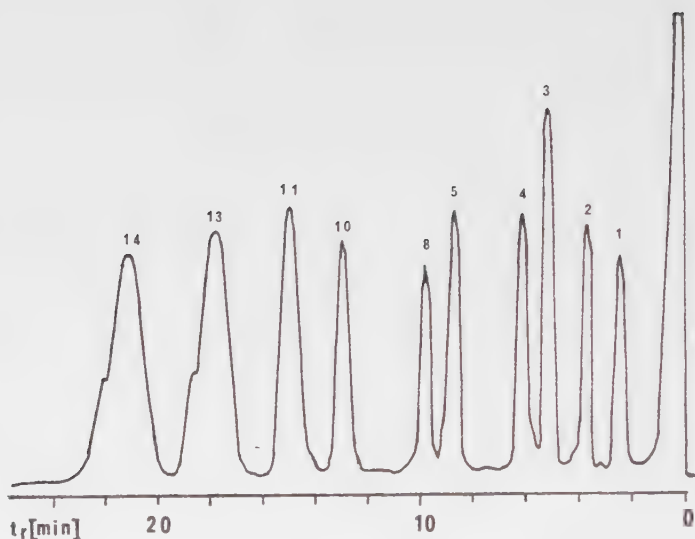


Abb. 36

GC von O-Methyl-Aldosemethyloxim-TMS-äther

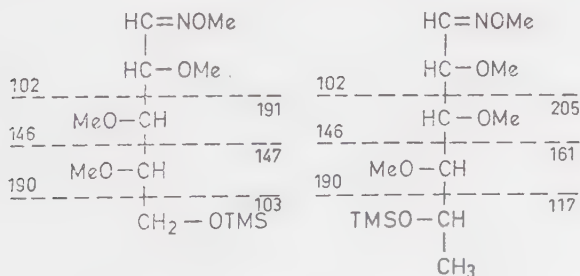
(2 m, 6x3 mm Glas, 10% UCCW-982, 165° isoth. 50 ml He/min)

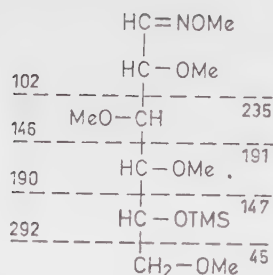
	t_r [min]	R_t
1) 2,3,4-Tri-O-methyl-L-arabinopyranose-methyloxim-5-trimethylsilyläther	2.6	0.47
2) 2,3,4-Tri-O-methyl-L-rhamnopyranose-methyloxim-5-trimethylsilyläther	4.0	0.73
3) 2,3,4,6-Tetra-O-methyl-D-glucopyranose-methyloxim-5-trimethylsilyläther	5.5	1.0
4) 2,3-Di-O-methyl-L-rhamnopyranose-methyloxim-4,5-bis-trimethylsilyläther	6.0	1.09
5) 2,3,4-Tri-O-methyl-D-glucopyranose-methyloxim-5,6-bis-trimethylsilyläther	8.9	1.62
6) 2,3,6-Tri-O-methyl-D-glucopyranose-methyloxim-4,5-bis-trimethylsilyläther	9.1	1.65
7) 2,4,6-Tri-O-methyl-D-glucopyranose-methyloxim-3,5-bis-trimethylsilyläther	9.4	1.70
8) 3,4,6-Tri-O-methyl-D-glucopyranose-methyloxim-2,5-bis-trimethylsilyläther	9.5	1.72

	$t_r [\text{min}]$	R_t
9) Trimethylsilyl-(2,3,4-tri-O-methyl-D-glucopyranuronat-methyloxim)-5-trimethylsilyläther	10.2	1.85
10) 3,6-Di-O-methyl-D-glucopyranose-methyloxim-2,4,5-tris-trimethylsilyläther	13.6	2.47
11) 2,3-Di-O-methyl-D-glucopyranose-methyloxim-4,5,6-tris-trimethylsilyläther	15.1	2.74
12) 2,4-Di-O-methyl-D-glucopyranose-methyloxim-3,5,6-tris-trimethylsilyläther	15.4	2.80
13) 6-O-Methyl-D-glucopyranose-methyloxim-2,3,4,5-tetra-(trimethylsilyläther)	18.2	3.31
14) 2-O-Methyl-D-glucopyranose-methyloxim-3,4,5,6-tetra-(trimethylsilyläther)	21.8	3.78

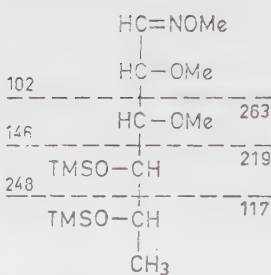
Aus den Massenspektren ist zu entnehmen, daß die bevorzugte Spaltung zwischen C-Kettengliedern mit OMe- und OTMS-Substitution stattfindet. Alle ungeraden Peaks stammen von Primärspaltprodukten, die das C-5 oder C-6-Ende, alle geradzahigen Massenzahlen dagegen von Fragmenten, die das C-1-Kettenende mit der Methyloximgruppe enthalten.

Sekundärfragmente bilden sich durch TMSOH-Verlust. Zwischen $1 \rightarrow 5$ verknüpften Furanosen und $1 \rightarrow 4$ verknüpften Pyranosen kann wie bei den Alditolen nicht unterschieden werden. Dagegen liefern die Glucuronsäure-methylester von den PM-Glucosen verschiedene MO-TMS-Derivate. Die Fragmentierungs-Schemata unterschiedlich methylierter Methylalldoxim-TMS-äther sind im folgenden dargestellt (Abb.37, S. 79), ebenso die Massenspektren (Abb.38, S. 79 u. Abb. 39,40,41, S. 80).

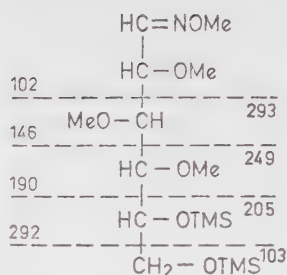




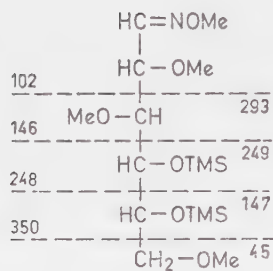
3)



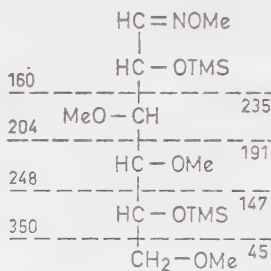
4)



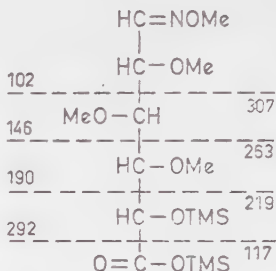
5)



6)



8)



9)

Abb. 37

Fragmentierung der O-Methyl-Aldosemethyloxim-TMS-äther

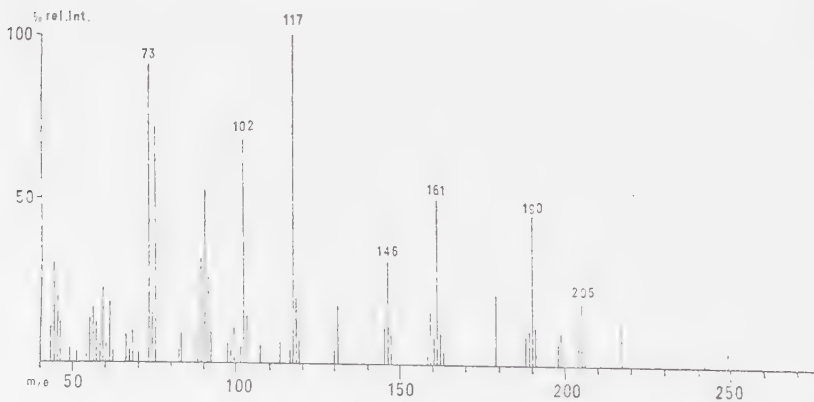


Abb. 38

MS von 2,3,4-Tri-O-methyl-L-rhamnosemethyloxim-5-trimethylsilyläther

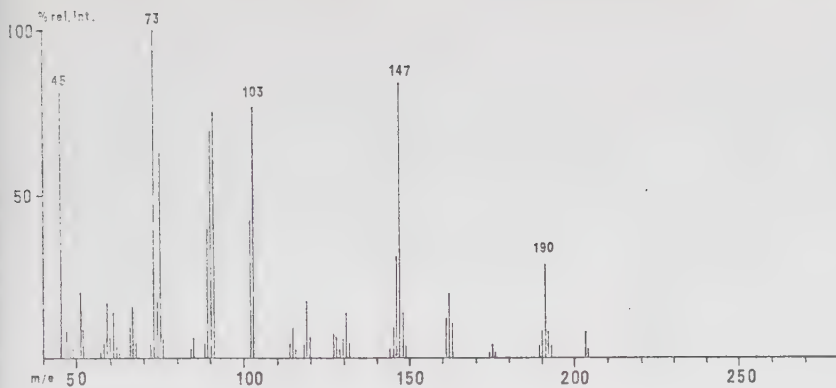


Abb. 39

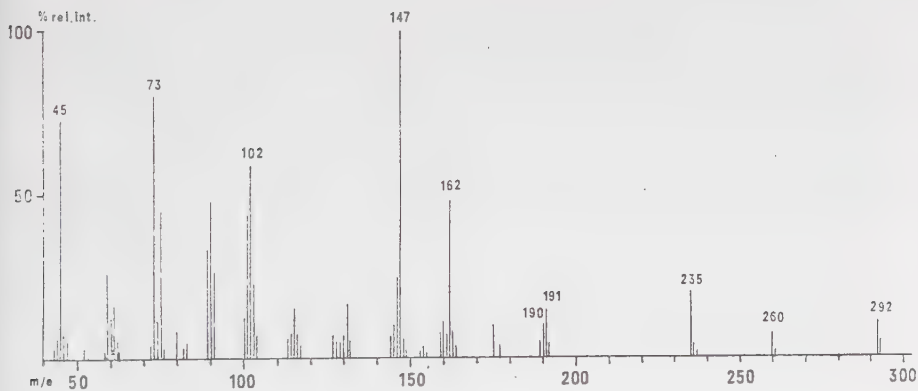


Abb. 40

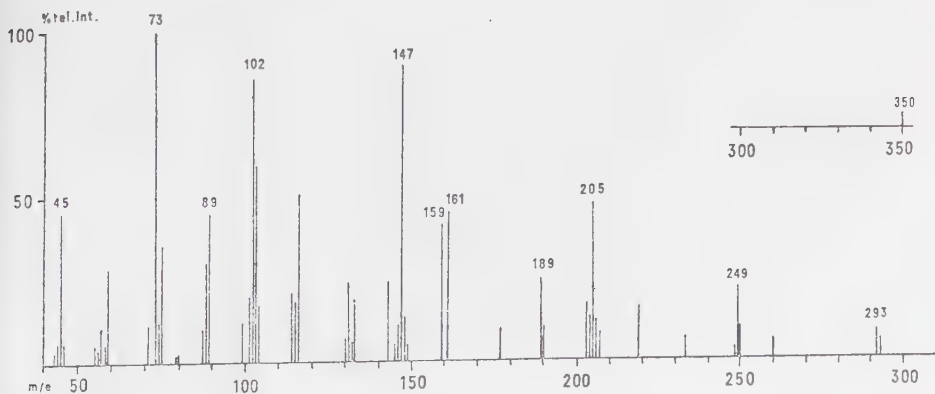


Abb. 41

3. Phenylglykoside

Die Umsetzung von partiell methylierten Zuckern zu Phenyl-0-glykosiden (36) zum Zweck der GC-MS-Untersuchung ist bisher nicht beschrieben worden. Diese Verbindungen liefern nach unseren Ergebnissen bei schonender Verdampfung im Direkteinlaß relativ intensive M^+ -Peaks mit 5-20% rel.Int., während diese bei indirektem Einlaß über das GC-Interface weniger gut zu erkennen sind. Wir bevorzugten deshalb die mikropräparative Gewinnung dieser Glykoside über den GC-Ausgang und MS-Untersuchung der Fraktionen im Direkteinlaßverfahren. Die jeweiligen Monosaccharid-Fragmente erlauben überdies eine Zuordnung auch ohne M^+ -Peaks.

Die Darstellung der Phenylglykoside geschah durch Zusammenschmelzen der partiell methylierten Zucker mit überschüssigem Phenol unter Protonsäure- oder Lewissäure-Katalyse. Diese nach Art der HELFERICH-Methode (157) verlaufende Reaktion läßt sich im Mikrobereich entgegen den für den präparativen Maßstab geltenden Vorschriften auch ohne Acetylierung am anomeren Zentrum durchführen. Es handelt sich wie bei der FISCHER-Synthese (157) um thermodynamisch gesteuerte Gleichgewichtsreaktionen. Auch die Transglykosylierung mit Phenol ist möglich. Wir erhielten überwiegend das β -Anomere, wie anhand synthetischer Vergleichsproben durch GC ermittelt wurde.

Die Retentionszeiten von 18 Phenyl-tetra-, tri-, di- und mono-0-methyl- β -glykopyranosiden sind im folgenden aufgeführt (Abb.42 S. 82).

	t_r [min]
1) Phenyl-2,3,4-tri-0-methyl-L-arabinopyranosid	0.6
2) Phenyl-2,3,4-tri-0-methyl-D-quinovopyranosid	1.0
3) Phenyl-2,3,4-tri-0-methyl-L-rhamnopyranosid	1.6
4) Phenyl-2,3,4-tri-0-methyl-D-fucopyranosid	2.5
5) Phenyl-2,3,4,6-tetra-0-methyl-D-glucopyranosid	2.5
6) Phenyl-2,3-di-0-methyl-D-quinovopyranosid	3.4
7) Phenyl-2,3-di-0-methyl-D-fucopyranosid	5.8
8) Phenyl-2,3,4-tri-0-methyl-D-glucopyranosid	7.0

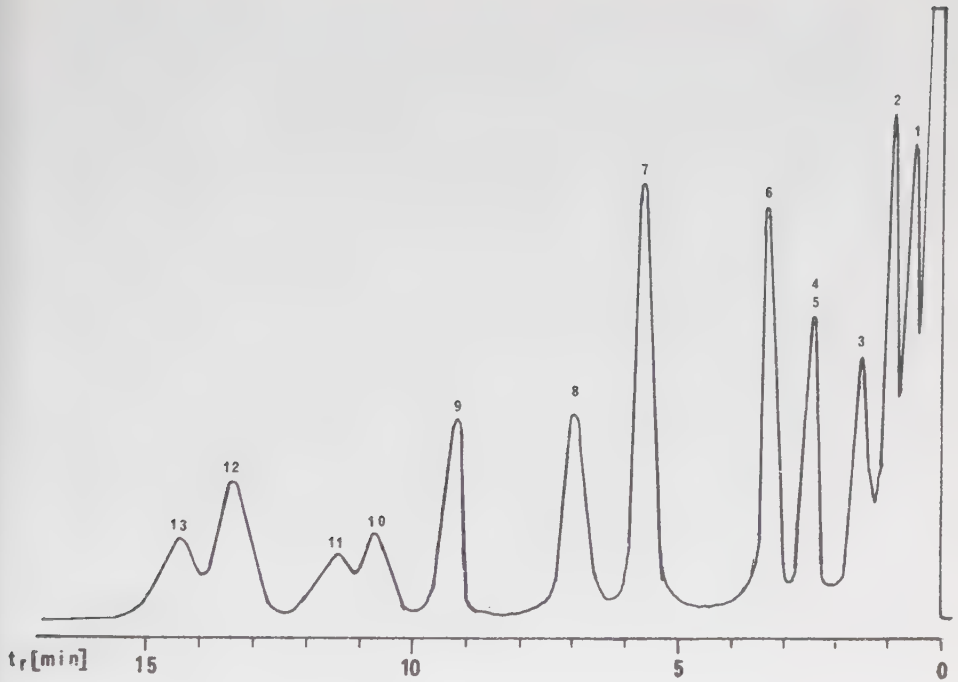


Abb. 42

GC von Phenyl-O-glykosid-methyläthern
(1.4 m, 6x3 mm, 3% ECNSS-M, 172° isoth. 70 ml He/min)

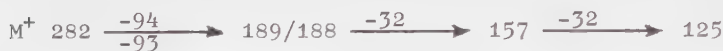
	t_r [min]
9) Phenyl-2,3,6-tri-O-methyl-D-glucopyranosid	9.3
10) Phenyl-3,4,6-tri-O-methyl-D-glucopyranosid	10.9
11) Phenyl-2-O-methyl-D-quinovopyranosid	11.5
12) Phenyl-3-O-methyl-quinovopyranosid	13.4
13) Phenyl-4-O-methyl-D-quinovopyranosid	14.5
14) Phenyl-3,4-di-O-methyl-D-glucopyranosid	32.0
15) Phenyl-2,6-di-O-methyl-D-glucopyranosid	32.3
16) Phenyl-4,6-di-O-methyl-D-glucopyranosid	39.2
17) Phenyl-3,6-di-O-methyl-D-glucopyranosid	39.4
18) Phenyl-2,3-di-O-methyl-D-glucopyranosid	81.0

Die Einführung einer aromatischen Gruppe mit niedrigem Ionisierungspotential als Aglykonanteil stabilisiert die Molekulationen und Glykosylreste. Diese Schlüsselfragmente liefern somit eine gute Unterscheidungsmöglichkeit zwischen voll- und teilmethylierten Phenylglykosiden, wie dies an folgenden Pentose-, Methylpentose- und Hexosederivaten deutlich wird.

Phenyl-tetra-0-methyl-hexopyranoside aus terminalen Hexosen:



Phenyl-tri-0-methyl-6-desoxy-hexopyranoside aus terminalen Methylpentosen:



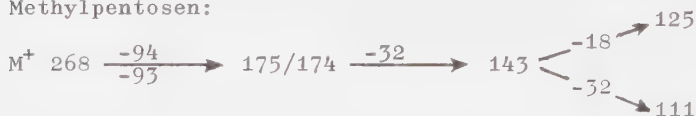
Phenyl-tri-0-methyl-pentopyranoside aus terminalen Pentosen:



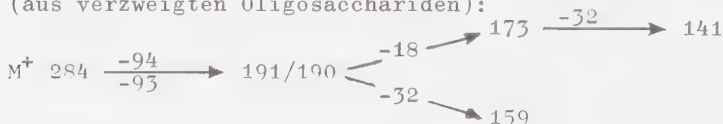
Phenyl-tri-0-methyl-hexopyranoside aus sekundären Hexosen:



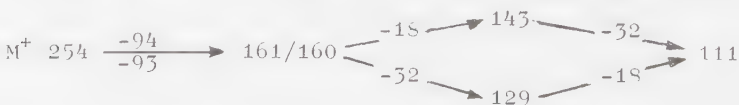
Phenyl-di-0-methyl-6-desoxy-hexopyranoside aus sekundären Methylpentosen:



Phenyl-di-0-methyl-hexopyranoside aus sekundären Hexosen (aus verzweigten Oligosacchariden):



Phenyl-mono-0-methyl-6-desoxy-hexopyranoside aus sekundären Methylpentosen (aus verzweigten Oligosacchariden):



Die Mono- und Dihydroxyverbindungen spalten einerseits MeOH, andererseits H_2O ab, was mehr oder weniger dominieren kann. Darüber hinaus unterscheiden sich die Spektren isomerer Verbindungen habituell durch die Intensität der Peaks. Ein sicherer Nachweis ist jedoch nur beim Vergleich mit Testproben möglich. (Abb. 43,44,45).

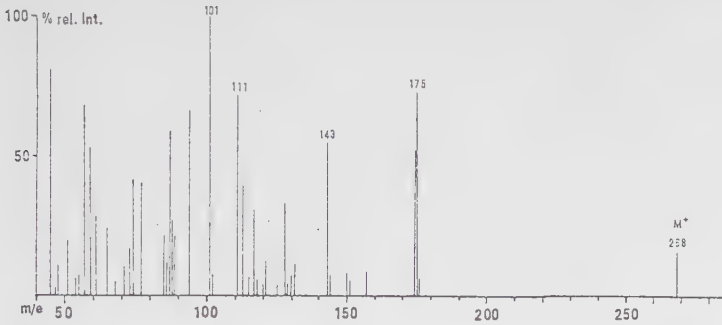


Abb. 43

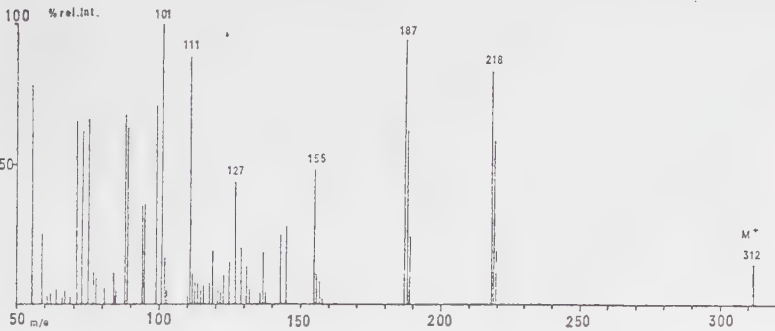


Abb. 44

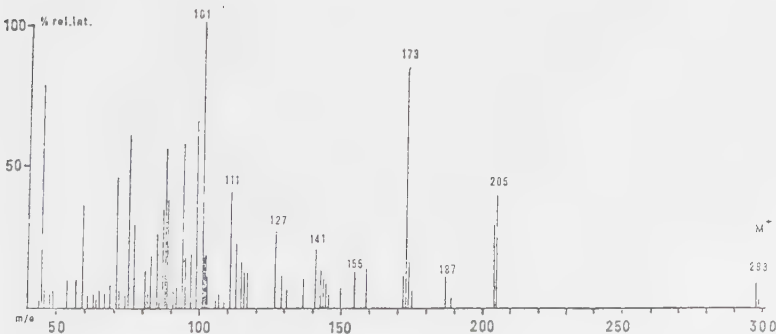


Abb. 45

4. Anilide

Die Kondensation von 2,3,4,6-Tetra-O-methyl-D-glucose mit Anilin wurde erstmals von IRWINE (158), später von PRINGSHEIM (159), durchgeführt. Die Reaktion ist thermodynamisch kontrolliert und verläuft nach unseren Resultaten auch gut im Mikromaßstab. Wir erhielten stets nur einen GC-Peak, vermutlich den des β -Glykosids (160-162), ebenso wie bei den anderen Methylzuckern. (Abb. 46)

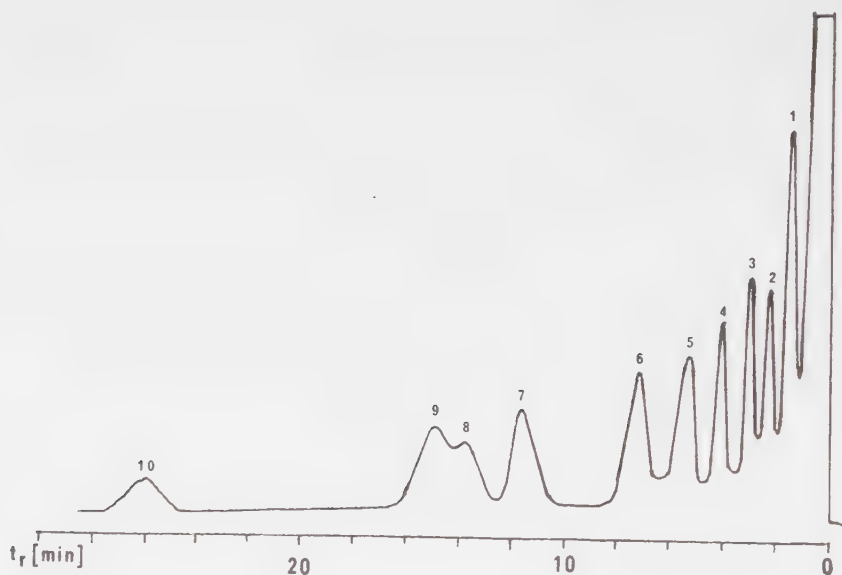


Abb. 46

GC von N-Phenyl-glykosylamin-methyläthern

(1.4 m, 6x3 mm, 3% ECNSS-M 168° isoth. 90 ml He/min)

	t_r [min]
1) N-Phenyl-2,3,4-tri-O-methyl-L-arabinopyranosylamin	1.8
2) N-Phenyl-2,3,4-tri-O-methyl-D-quinovopyranosylamin	2.5
3) N-Phenyl-2,3,4-tri-O-methyl-D-xylopyranosylamin	3.2
4) N-Phenyl-2,3,4-tri-O-methyl-L-rhamnopyranosylamin	4.0
5) N-Phenyl-2,3,4,6-tetra-O-methyl-D-glucopyranosylamin	5.4

	t_r [min]
6) N-Phenyl-2,3-di-O-methyl-D-fucopyranosylamin	7.0
7) N-Phenyl-2,3-di-O-methyl-D-quinovopyranosylamin	11.5
8) N-Phenyl-3,4,6-tri-O-methyl-D-glucopyranosylamin	14.0
9) N-Phenyl-2,3,4-tri-O-methyl-D-glucopyranosylamin	15.1
10) N-Phenyl-2,3,4-tri-O-methyl-D-galaktopyranosylamin	26.0

Die Massenspektren wurden bis jetzt nur von N-Phenyl-glykosylaminacetaten beschrieben (163). Sie zeichnen sich durch starke Molekülionen aus. Die Spaltung der glykosidischen Bindung tritt hier in den Hintergrund. Dagegen sind die Fragmente: Base +1, +29, +30, +43, +84, +85 typisch für diese Verbindungen.

Die MS der partiell und voll methylierten Anilide zeigen ebenso starke M^+ -Peaks. Aufgrund der erhaltenen Molekülmassen kann man bereits eine Vorentscheidung über Zuckerbausteine treffen, die bis jetzt in Polyphenolglykosiden aufgefunden wurden.

Terminale Zucker ergeben als N-Phenyl-glykosylaminderivate:

MG 311:	2,3,4,6-O-CH ₃ -Glu; 2,3,4,6-OCH ₃ -Gal
MG 281:	2,3,4-OCH ₃ -Rha;
MG 267:	2,3,4-OCH ₃ -Xyl; 2,3,4-OCH ₃ -Ara; 2,3,3'-OCH ₃ -Api;

Sekundäre Zucker ergeben als N-Phenyl-glykosylaminderivate:

MG 297:	2,3,4-OCH ₃ -Glu	z.B. aus Rutinose, Gentiobiose, Gentiotriose, Primverose, Vicianose
	3,4,6-OCH ₃ -Glu	z.B. aus Neohesperidose, Sophorose, Sophorotriose, Sambubiose, Apiobiose
	2,3,4-OCH ₃ -Gal	aus Robinobiose
	3,4,6-OCH ₃ -Gal	aus Lathyrose
MG 267:	2,3-OCH ₃ -Rha	
	2,4-OCH ₃ -Rha	aus Dirhamnogalaktosiden
	3,4-OCH ₃ -Rha	
MG 283:	3,4-OCH ₃ -Glu	aus 2-O-Glucosylrutinose

Charakteristisch für die Fragmentierung der von uns untersuchten Anilide ist die wiederholte Abspaltung von Methanol vom Molekülion. (Abb. 47, 48, 49, S. 87)

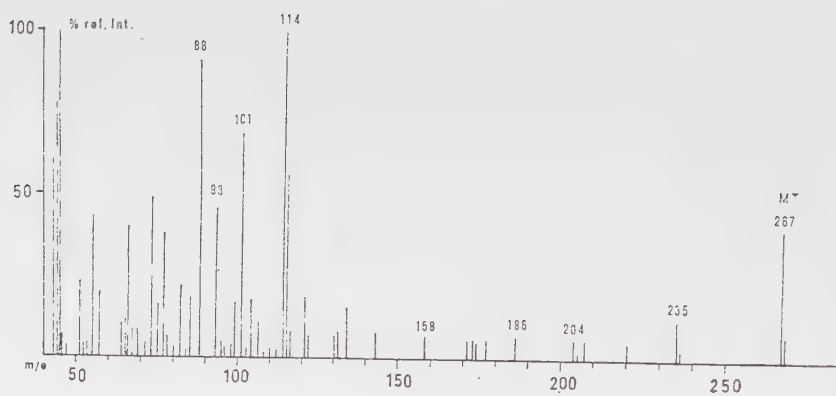


Abb. 47

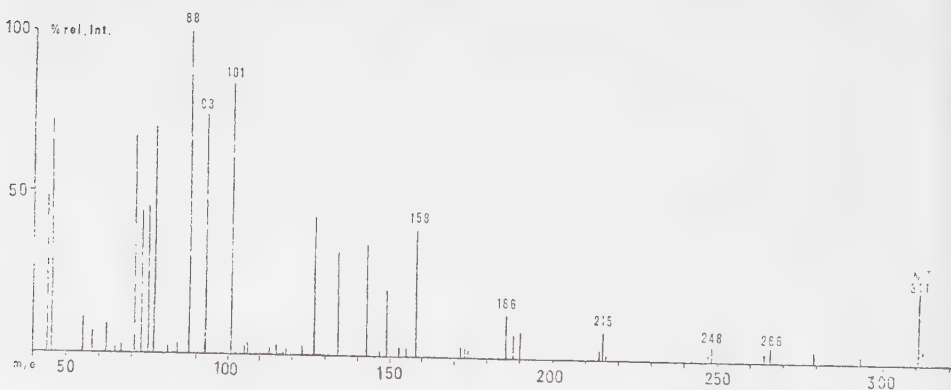


Abb. 48

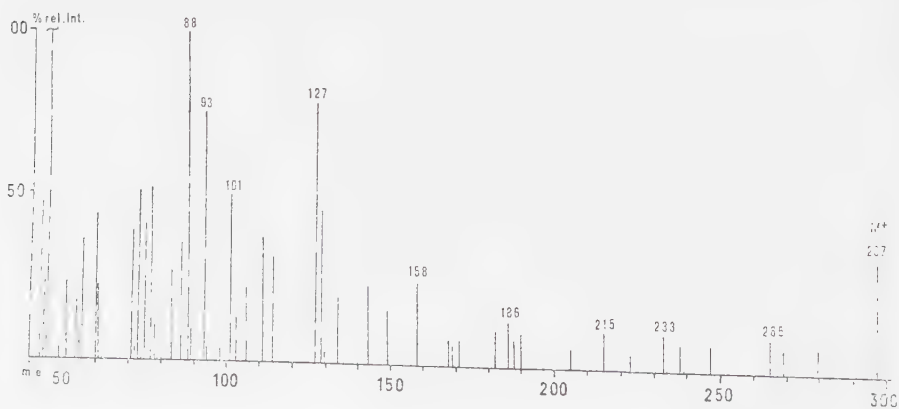


Abb. 49

Bei der Analyse von Acylglykosiden besteht - wie erwähnt - die Möglichkeit der Hydrolyse oder Acylwanderung genuin vorhandener Acylgruppen. Um die Zuordnung derselben an definierte Zuckerpositionen durchführen zu können, wurde deshalb folgende Abänderung der Methylierungsanalyse vorgeschlagen (131,164):

Zuerst werden die freien OH-Gruppen des Acylzuckers durch Acetalbildung z.B. mit Methylvinyläther blockiert. Die anschließende Permethylierung nach HAKOMORI ersetzt die in Frage kommende Acylgruppe durch CH_3 , ohne daß die basenstabilen Acetalgruppen angegriffen werden. Erst bei der säurekatalysierten Hydrolyse werden dann die Schutzgruppen abgespalten. Es resultieren also Monomethyläther von Monosacchariden, welche nach Derivatisierung mit Hilfe von Testsubstanzen und GC-MS identifiziert werden müssen. Mit dieser Methode sollen Acylwanderungen vermieden werden.

Wir haben für die Strukturanalyse von Polyphenolglykosiden einen Analysengang ausgearbeitet, der mit Hilfe der 4 beschriebenen Zuckerderivate durchgeführt werden kann. Diese Methode haben wir an mehreren Monosiden und Biosiden getestet. Sie soll hier am Beispiel eines Flavonol-monosids und eines Anthrachinon-biosids demonstriert werden, wobei eine Kurzschreibweise Verwendung findet (Abb. 50, S. 89 und Abb. 51, S. 90). Eine Acetylierung der Glykoside und deren Massenspektroskopie kann dem Analysengang vorangestellt werden.

Aus 2 mg Quercetin-3- α -L-arabinopyranosid (Guaijaverin) erhält man nach Permethylierung und Methanolyse Quercetin-3',4',5,7-tetramethyläther und Methyl-2,3,4-tri-O-methyl-L-arabinopyranosid. Der Quercetin-tetramethyläther kann durch Filtrieren oder Zentrifugieren abgetrennt und massenspektroskopisch identifiziert werden. Nach Hydrolyse des Methylglykosids wurde ein Teil des Hydrolysats zu 2,3,4-Tri-O-methyl-L-arabit (Abb.36,P.4, Abb. 39) reduziert und acetyliert. Ein weiterer Teil wurde zu 2,3,4-Tri-O-methyl-L-arabinose-methyloxim und weiter zu 2,3,4-Tri-O-methyl-5-O-trimethylsilyl-L-arabinose-methyloxim (Abb.36, Peak 1; Abb. 39) umgesetzt. Aus dem Hydrolysat können ferner Phenyl-2,3,4-tri-O-methyl-L-arabinopyranosid (Abb. 42, Peak 1; Abb. 43) und N-Phenyl-2,3,4-tri-O-methyl-L-arabinopyranosyl-

amin (Abb. 46, Peak 1; Abb. 47) hergestellt werden. Alle Arabinosederivate wurden zusammen mit Testgemischen gaschromatographiert und zugleich gereinigt. Von den in Frage kommenden Peaks wurden dann durch GC-MS die Massenspektren erhalten.

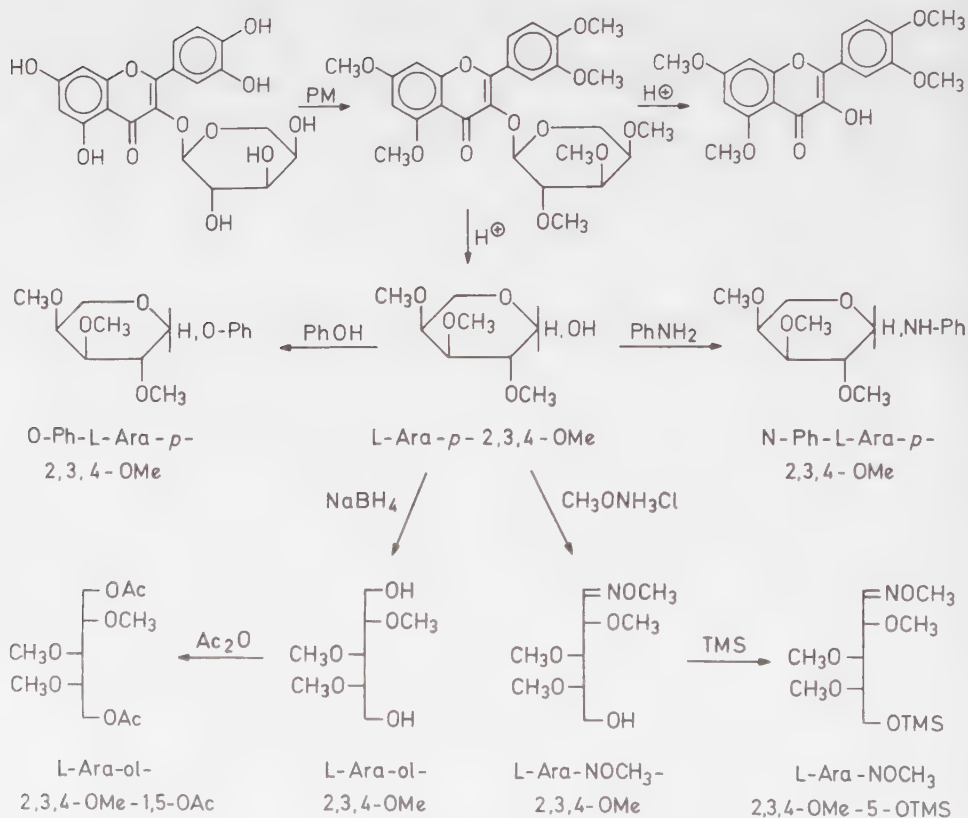


Abb. 50

Methylierungsanalyse von Guaijaverin

Ca. 3 mg Emodin-8- β -gentiobiosid wurden nach Permethylierung und MS mit H_2SO_4 hydrolytisch gespalten und vom Aglukon abfiltriert. Der Rückstand ließ sich massenspektroskopisch als Emodin-1,6-di-methyläther identifizieren. Im neutralisierten Hydrolysat befanden sich dann 2,3,4,6-Tetra-O-methyl-D-glucopyranose und 2,3,4-Tri-O-methyl-D-glucopyranose, deren Reduktion mit Natriumborhydrid und anschließende Acetylierung 2,3,4,6-Tetra-O-methyl-D-glucit-1,5-diacetat (Abb. 32, Peak 5; Abb. 34) und 2,3,4-Tri-O-methyl-D-glucit-1,5,6-triacetat (Abb. 32, Peak 7; Abb. 35) ergab. Ebenso kann man aus den partiell methylierten Zuckern die beiden Oxime 2,3,4,6-Tetra-O-methyl-D-glucose-methyloxim-5-TMS-äther (Abb. 36, Peak 3; Abb. 40) und 2,3,4-Tri-O-methyl-D-glucose-methyloxim-5,6-bis-TMS-äther (Abb. 36, Peak 5; Abb. 41) darstellen. Die Glykosidierung aliquoter Teile des Hydrolysats mit Phenol führte zu Phenyl-2,3,4,6-tetra-O-methyl-D-glucopyranosid (Abb. 42, Peak 5; Abb. 44) und Phenyl-2,3,4-tri-O-methyl-D-glucopyranosid (Abb. 42, Peak 8; Abb. 45). Die Kondensation mit Anilin lieferte N-Phenyl-2,3,4,6-tetra-O-methyl-D-glucopyranosylamin (Abb. 46, Peak 5; Abb. 48) und N-Phenyl-2,3,4-tri-O-methyl-D-glucopyranosylamin (Abb. 46, Peak 9; Abb. 49). Die Bestimmung der Retentionszeiten mit Hilfe von Testgemischen und das Studium der Massenspektren führten zur Identifizierung der Verbindungen, sodaß in den meisten Fällen auf einen Vergleich mit authentischen Testsubstanzen verzichtet werden konnte.

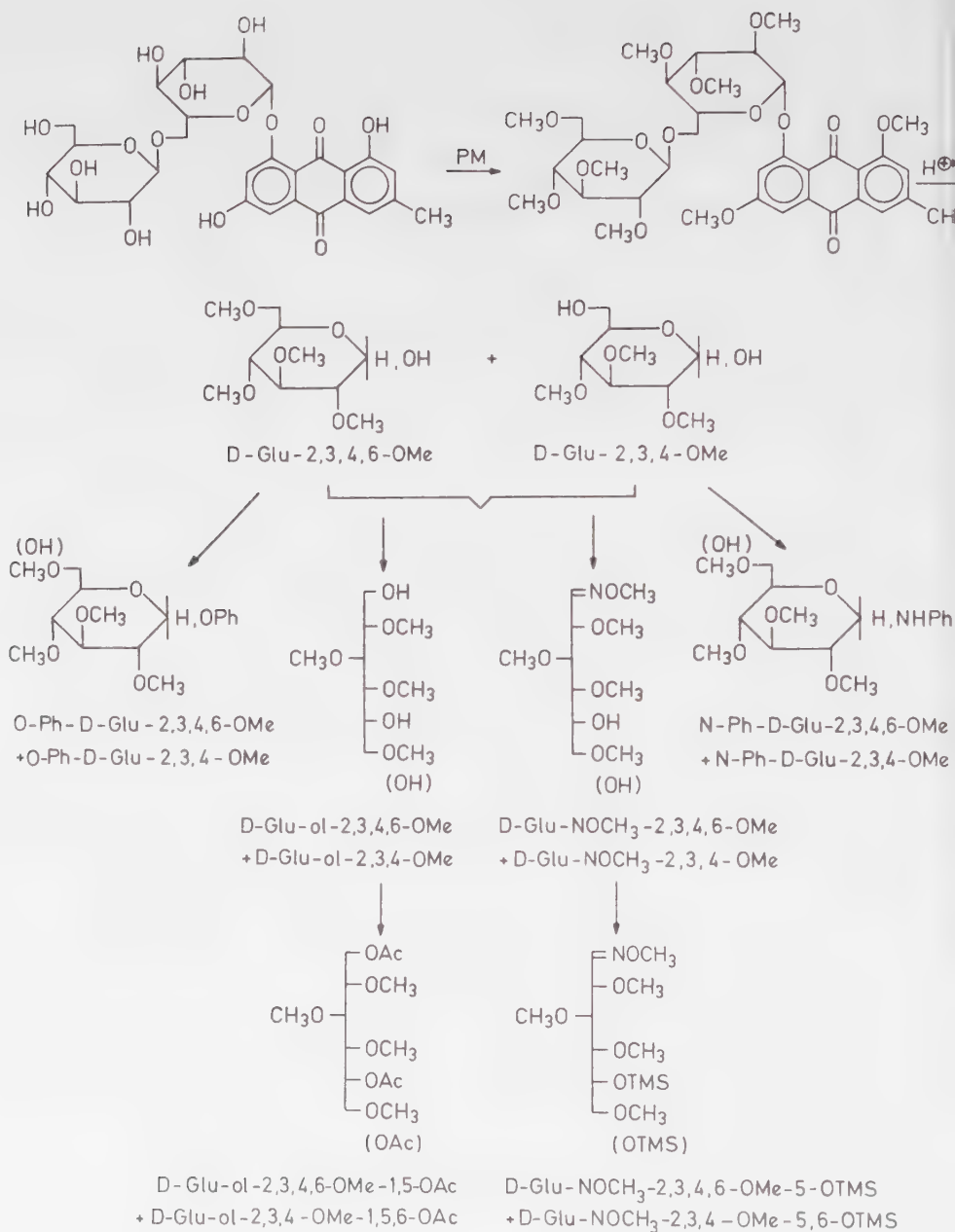


Abb. 51

Methylierungsanalyse von Emodin-8-gentiobiosid

VII. Strukturanalyse der Flavonoid-aglyka durch GC-MS ihrer Abbauprodukte

Die Vielzahl der Substitutionsmöglichkeiten bei polyphenolischen Pflanzeninhaltsstoffen erschwert die massenspektroskopische Strukturanalyse, da Substitutions-Isomere häufig sehr ähnliche Spektren ergeben. In dieser Hinsicht hat die Massenspektrometrie nicht die Beweiskraft anderer spektroskopischer Methoden. Durch Nachweis von Abbauprodukten kann dieser Umstand verbessert werden. Die bei den üblichen Abbaureaktionen entstehenden Gemische müssen für die MS-Untersuchung getrennt werden. Wir haben also - ähnlich wie bei den Zuckern - die GC mit der MS kombiniert, um Isomere bereits anhand ihrer Retentionswerte zu unterscheiden.

Es wurden im Rahmen unserer MS-Studien an Flavonoiden auch die Abbauprodukte verschiedener Flavonoidklassen durch GC-MS untersucht. Wir haben uns dabei auf 3 Abbauverfahren beschränkt:

1. Alkaliabbau mit verd. NaOH oder KOH
2. Reduktiver Abbau im alkalischen Milieu und
3. Oxidativer Abbau im alkalischen Milieu.

Abbauversuche von Flavonoiden im sauren Medium, z.B. mit H_2O_2 (165), $KMnO_4$ (166), $AlCl_3$ (167) sind weniger gebräuchlich. Hier bedarf es ziemlich rigoroser Bedingungen, da der Flavonoidkern relativ säurebeständig ist. Die dabei erhaltenen Abbauprodukte sind deshalb in der Regel von komplexer Zusammensetzung und nur für spezielle Problemstellungen aufschlußreich.

1. Alkaliabbau mit verd. Laugen

Die übliche Art des Alkaliabbaus war früher die Alkalischmelze (168). Sie ergab jedoch vorwiegend nur Phenolcarbonsäuren aus dem B-Ring. Es können hierbei Entmethylierungen und Dehydroxylierungen eintreten. Eine Differenzierung zwischen Flavonoiden verschiedener Oxidationsstufen ist hiermit nicht möglich.

Abbau durch Erhitzen in konzentrierten alkalischen Lösungen liefert neben den Säuren oft auch Acetophenone und

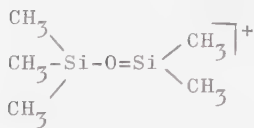
Phenole des A-Rings (169). Hierbei soll unter N_2 -Spülung gearbeitet werden, um Oxidationen durch Luft- O_2 möglichst gering zu halten. Unsere Versuche zeigten jedoch, daß die Reproduzierbarkeit, besonders bei Flavonolen (170), zu wünschen übrig läßt. Verschiedene Flavonoide erfordern unterschiedliche Behandlung hinsichtlich Reaktionszeit und Stärke der einwirkenden Alkalien, will man vergleichbare Abbauprodukte erhalten (171). Je nach Substitutionstyp zeigen die Verbindungen erhebliche Abweichungen in der Alkaliempfindlichkeit. Flavonole vom Quercetagetin-Typ sind z.B. wesentlich alkaliempfindlicher als solche des Quercetin-Typs. Das gleiche gilt auch für die Abbauprodukte Hydroxyhydrochinone und Tetrahydroxybenzole (172). Diese sind in alkalischer Lösung nicht beständig und somit kaum zu fassen.

Phenole aus dem A-Ring werden bei Anwendung von Mikromethoden meist nur dünnstichtchromatographisch nachgewiesen (173).

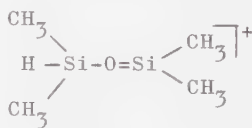
Die beschriebenen Schwierigkeiten veranlaßten uns, verschiedene Flavonoide bei möglichst milden alkalischen Bedingungen (mit 2N Natronlauge in 2 Stdn.) abzubauen.

Einfach gebaute Flavonoide ergaben dann stets A- und B-Ring-Abbauprodukte, welche durch GC-MS identifiziert werden konnten. Die Silylierung der Gemische hat sich hierbei als vorteilhaft erwiesen. Aus 1 mg Luteolin wurden beispielsweise Phloroglucin, Phloracetophenon und Protocatechusäure erhalten und anschließend als TMS-Derivate durch GC-MS identifiziert.

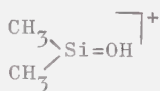
In den Massenspektren sind die M-CH₃-Peaks allgemein für TMS-Derivate charakteristisch. Daneben werden bei phenolischen Verbindungen M-74 und M-89-Fragmente beobachtet, bei orthoständigen OTMS-Gruppierungen auch M-88-Fragmente. Im unteren Massenbereich treten bevorzugt Signale bei m/e 149, 147, 135, 133, 75, 73 auf (174,95).



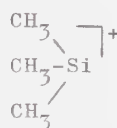
147



133



75



73

Phenolcarbonsäuren wurden als TMS-Derivate zum Acylrest abgebaut und verlieren unter Umlagerung CO_2 (175) (Abb. 52).

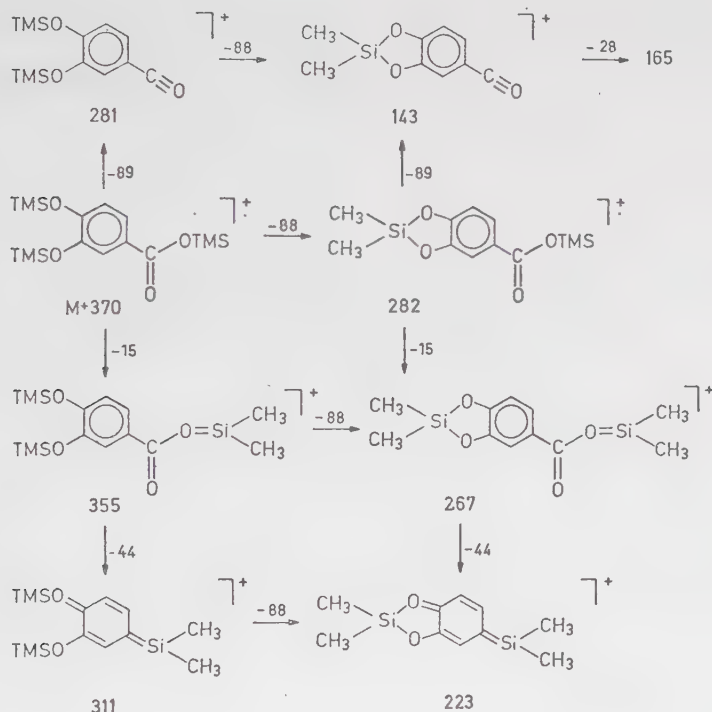


Abb. 52

Fragmentierung der PTMS-Protocatechusäure

Acetophenonderivate wie Phloracetophenon-pertrimethylsilyl-äther sind charakterisiert durch CH_3 -Abspaltung und CO -Verlust.
 $M^+ 384 \xrightarrow{-15} 369 \xrightarrow{-28} 341$

Die Eliminierung von Trimethylsilan (m/e 74) findet vom $M-15$ -Fragment statt.

Der Abbau höher substituierter Flavonoide im Mikromaßstab war auch unter schonenden Bedingungen schlecht reproduzierbar.

Die Retentionszeiten verschiedener Flavonoidabbauprodukte als PTMS-Derivate sind Abb. 53 zu entnehmen.

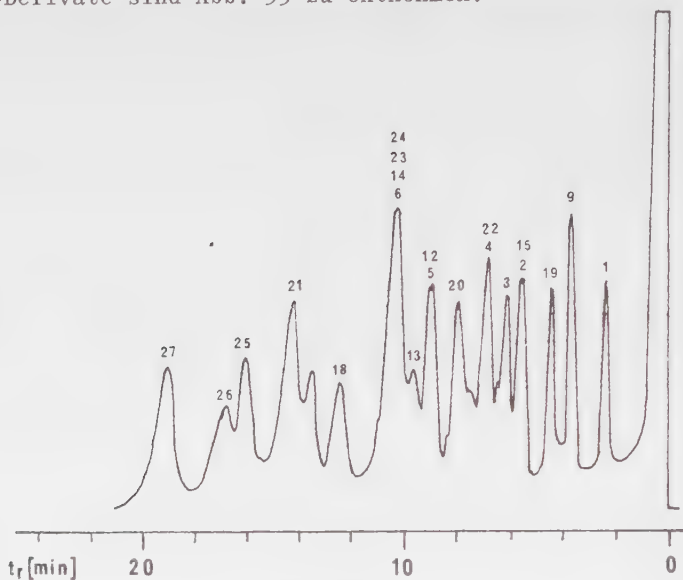


Abb. 53

GC von Flavonoidabbauprodukten als PTMS-Derivate

(2m,6x3 mm, 10% UCCW - 987, 140 - 240⁰, 5⁰/min, 46 ml He/min)

t_r [min]

Phenolcarbonsäuren

1) Benzoesäure	2.2
2) p-Hydroxybenzoesäure	5.4
3) Anissäure	6.0
4) Protocatechusäure	6.8
5) Vanillinsäure	8.8
6) Veratrumsäure	10.0
7) Resorcylsäure	11.4
8) Gallussäure	12.6

Phenole

9) Resorcin	3.6
10) Pyrogallol	5.2
11) Methylphloroglucin- β -monomethyläther	8.2
12) Phloroglucin	8.8
13) Methylphloroglucin	9.6
14) Phloroglucinmonomethyläther	10.4

	t_r [min]
<u>Acetophenone</u>	
15) p-Hydroxyacetophenon	5.6
16) Acetovanillon	7.6
17) Phloracetophenon	10.0
18) Methylphloracetophenon	12.4
<u>Dihydrozimtsäuren</u>	
19) Hydrozimtsäure	4.4
20) p-Hydroxyhydrozimtsäure	8.0
21) Hydrokaffeesäure	14.4
<u>Zimtsäuren</u>	
22) Zimtsäure	6.8
23) Methoxyzimtsäure	10.2
24) p-Cumarsäure	10.6
25) Kaffeesäure	16.0
26) Ferulasäure	16.8

Eine systematische Analyse von Alkaliabbauprodukten im Mikro-
maßstab läßt sich nach unseren Erfahrungen nur mit voll ver-
ätherten Flavonoiden erreichen. Unter milden Bedingungen mit
5-10%iger alkoholischer Kalilauge sind methylierte Flavone
und Flavonole wiederholt zu Acetophenonen und Phenolcarbonsäu-
ren abgebaut worden (176-180). Flavonoid-permethyl-(oder
-äthyl-)äther spalten einheitlich nach Art einer Retro-ALLAN-
ROBINSON-Kondensation auf.

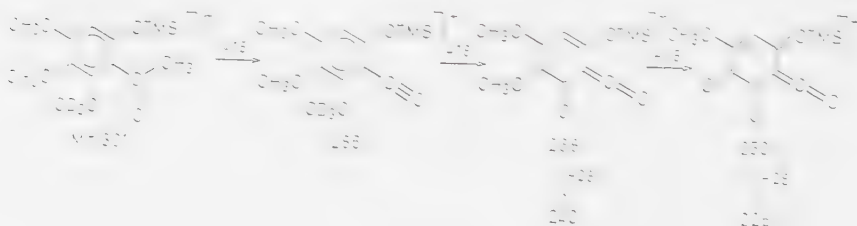
So ergeben:	aus dem A-Ring	aus dem B-Ring
PM-Flavone:	2-Hydroxyacetophenone	Phenolcarbonsäuren
PM-Flavonole:	2-Hydroxy- ω -methoxy- acetophenone	Phenolcarbonsäuren
PM-Isoflavone:	Phenolmethyläther	Phenyllessigsäuren
PM-Flavanone, PM-Chalkone:	2-Methoxyacetophenone	Zimtsäuren und Phenolcarbonsäuren

Eine Differenzierung zwischen Flavonolen und 3-Methoxy-
flavonen konnten wir nach Deuteromethylierung erreichen, da
dann aus Flavonolen 2-Hydroxy- ω -deuteromethoxyacetophenone
entstehen. Außerdem werden durch die deuterierende Methylierung
ursprünglich vorhandene Methoxylsubstituenten erkannt. Die bei
der Methylierungsanalyse von Glykosiden anfallenden Aglyka
können auf diese Weise weiter auf ihre Struktur untersucht werden.

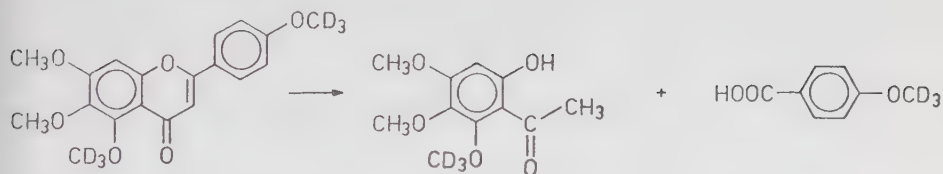
Die Trennung der phenolischen von den sauren Abbauprodukten wird durch Ausschütteln der Säuren aus hydrogencarbonat-haltigen Lösungen erreicht. Die Abtrennung der Phenole von den neutralen Phenoläthern und Acetophenonen geschieht durch Ausschütteln mit NaOH-Lösung. Anschließend werden die vorgetrennten Abbauprodukte zur besseren Gaschromatographie silyliert.

KUPCHAN und Mitarb. (181) haben ähnliche methoxylierte Acetophenone durch MS identifiziert. Auch die O-Äthylierung ist wiederholt herangezogen worden (182). Da bisher aber keine systematischen Untersuchungen von Abbauprodukten alkylierter Flavonoide im Mikromaßstab vorlagen, haben wir mit Hilfe der GC-MS-Analytik diese Verbindungen überprüft und die Gangbarkeit der Methode getestet. Es zeigte sich dabei, daß die in Abb. 54, S. 98, aufgeführten Beispiele von Spaltprodukten als repräsentativ anzusehen sind. Sie fallen als Hauptprodukte an und sind sowohl durch ihre Retentionszeiten als auch durch ihre Massenspektren zu unterscheiden, wobei die Phenol- und Säurefraktionen vor und nach Silylierung identifiziert werden können.

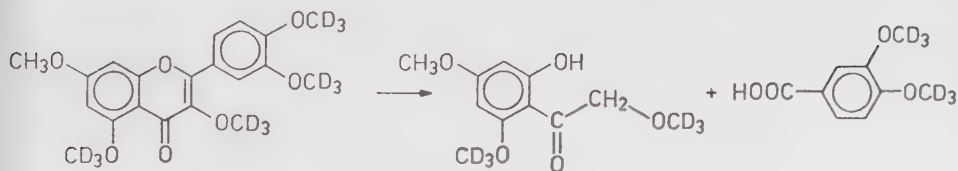
Flavone (Abb. 54, I) liefern in der Phenolfraction 2-Hydroxy-acetophenone, die typische Aroyl-Fragmente als Base-Peaks geben (M-15). Die TMS-Äther der 2-Hydroxy-acetophenone weisen ebenfalls einen sehr starken Aroyl-Peak auf. Der Molekülpeak ist indessen oft schwach ausgeprägt und weniger signifikant, da ein Aroyl+73-Peak durch Silylgruppenwanderung entsteht. Beispiel: 2-Hydroxy-4,5-dimethoxy-6-(trideutero)-methoxy-acetophenon-TMS-äther (Abb. 55, S. 101).



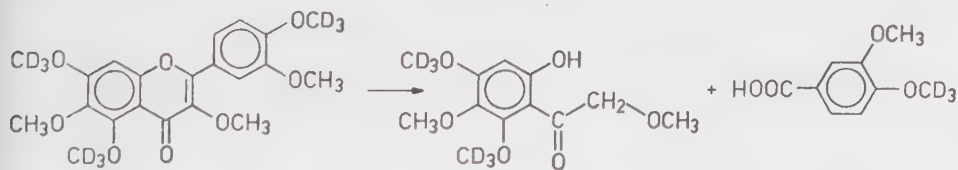
I. PDM - Flavone (Cirsimaritin)



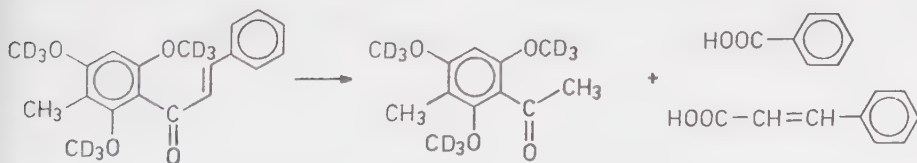
II. PDM - Flavonole (Rhamnetin)



III. PDM - 3-Methoxy - Flavone (Jaceidin)



IV. PDM - Flavanone u. -Chalkone (Strobopininchalkon)



V. PDM - Isoflavone (Orobol)

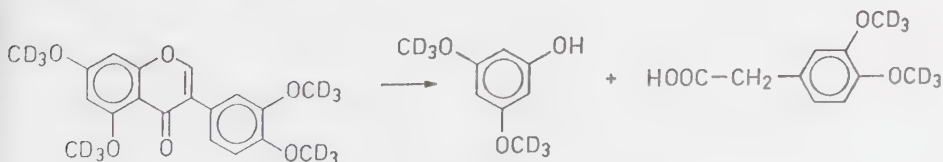
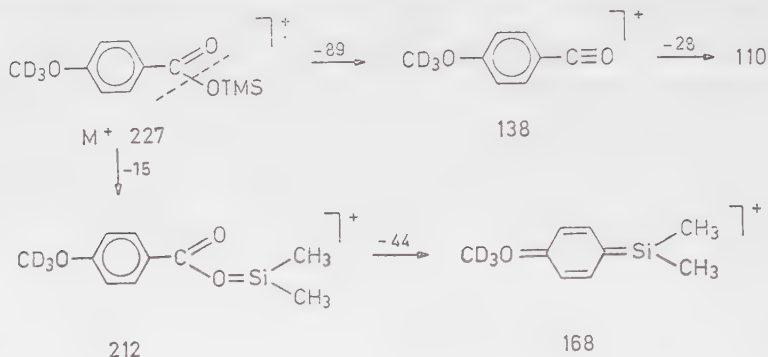


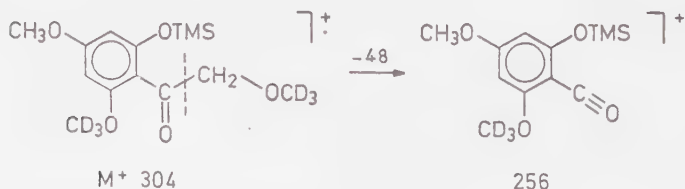
Abb. 54

In der Säurefraktion sind die Phenolcarbonsäuren des Seitenphenyls direkt oder nach Trimethylsilylierung leicht zu identifizieren, da sie, wie bereits beschrieben, deutlich CO_2 abspalten.

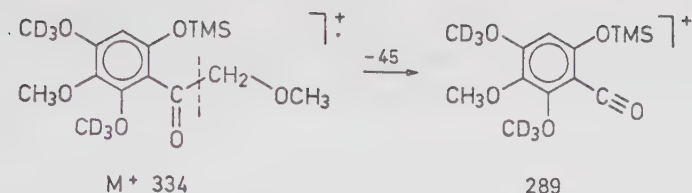
Beispiel: Trideutero-anissäure-TMS-ester (Abb. 56, S. 101).



Flavonole: Beim Abbau von Rhamnetin-tetra-(trideutero)-methyläther und Jaceidin-tris-(trideutero)-methyläther wird erkennbar, daß PDM-Flavonole und PDM-3-Methoxy-flavonole durch ihre Acetophenonderivate unterschieden werden können. Die Massenspektren der silylierten und unsilylierten Verbindungen sind gekennzeichnet durch Base-Peaks, die durch Abspaltung von M-48 bzw. M-45 gebildet werden.

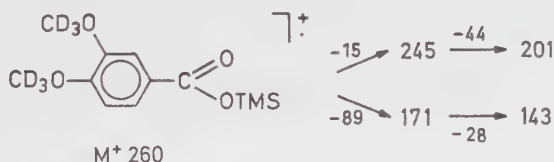


2-Trimethylsilyloxy- ω ,6-bis-(trideuteromethoxy)-4-methoxy-acetophenon (Abb. 57, S. 101).

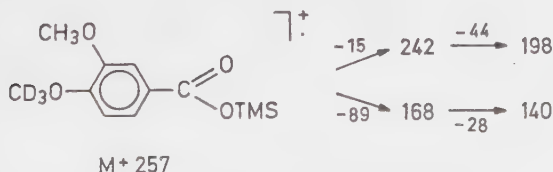


2-Trimethylsilyloxy-4,6-bis-(trideuteromethoxy)-ω,5-methoxy-acetophenon.

Die Substitution im Seitenphenyl ergibt sich aus der Massendifferenz von d_6 -Veratrumsäure und d_3 -Vanillinsäure-methyläther



3,4-Bis-(trideuteromethoxy)-benzoesäure-trimethylsilylester
(Abb. 58, S. 101)



3-Methoxy-4-trideuteromethoxy-benzoesäure-trimethylsilylester

Flavanone, die im Mikromaßstab nach BRIMACOMBE oder HAKOMORI methyliert werden, sind wie PM-Chalkone zu betrachten und liefern beim Abbau 2-Methoxy-acetophenone aus dem A-Ring. Sie fallen im Rückstand der Ausschüttelungen an. Mit Dimethylsulfat oder Diazomethan methylierte Flavanone isomerisieren unter Umständen erst beim Alkaliabbau und geben dann gleiche 2-Hydroxy-acetophenone wie die entsprechenden Flavone. Aus dem B-Ring werden neben den Phenolcarbonsäuren auch Zimtsäuren gebildet.

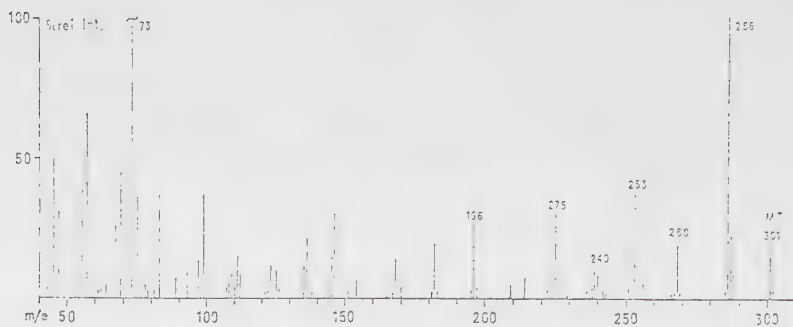


Abb. 55

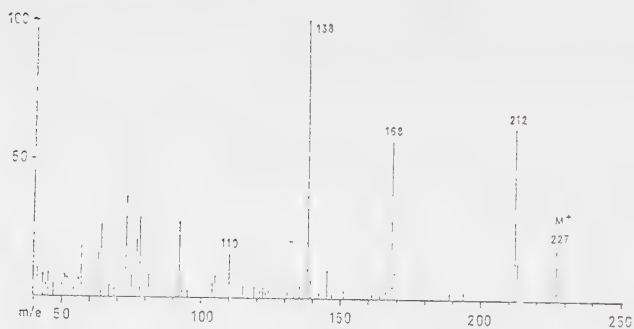


Abb. 56

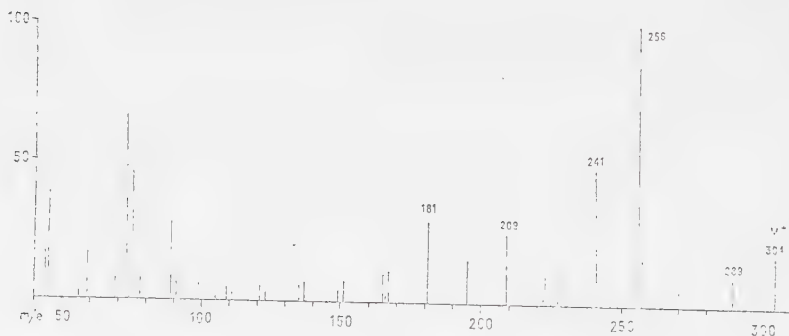
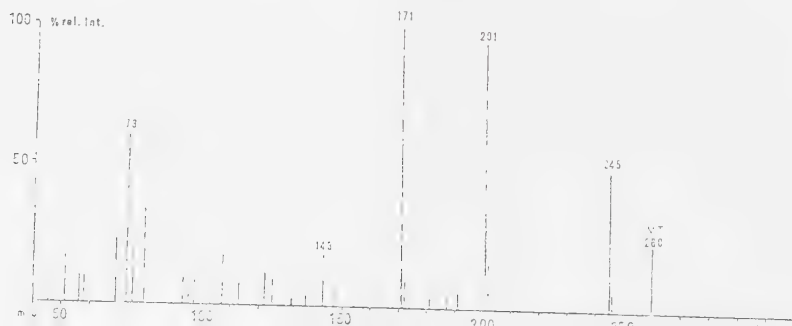
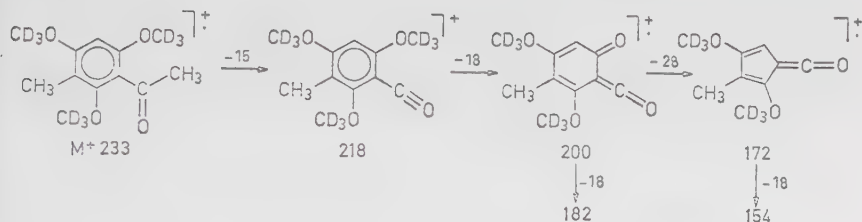


Abb. 57



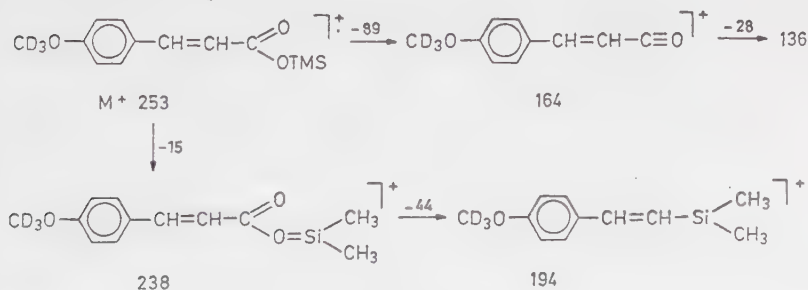
In den Massenspektren sind die Aroylreste als Base-Peaks typisch für die entstandenen Acetophenone. Der weitere Abbau läßt sich im Vergleich mit den methylierten Produkten verfolgen.



Beispiel:

2,4,6-Tris-(trideuteromethoxy)-3-methyl-acetophenon (Abb. 59, S. 104)

Zimtsäure und methoxy-homologe Zimtsäuren wurden als TMS-Derivate erfaßt. Ihre Fragmentierung verläuft analog den Phenolcarbonsäuren über einen Cinnamoylrest und zu Dimethylsilylbruchstücken durch CO₂-Eliminierung (183).

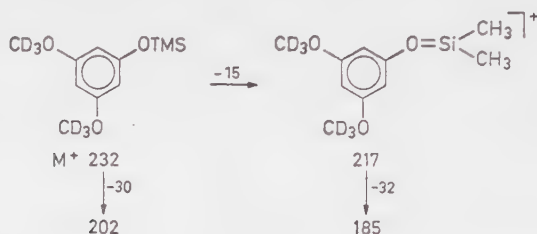


Beispiel:

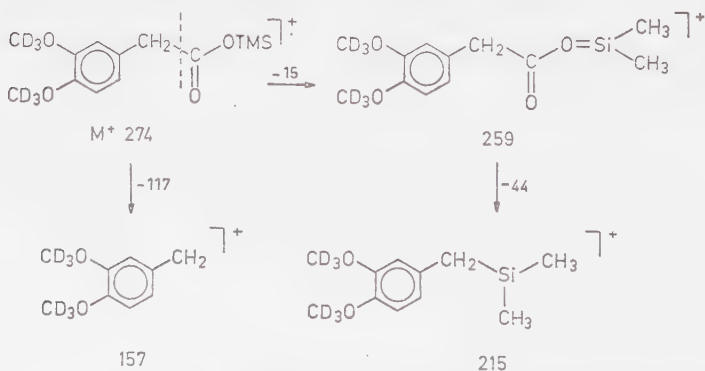
p-Trideuteromethoxy-zimtsäure-trimethylsilylester (Abb. 60, S. 104)

Isoflavone: Die perdeuteromethylierten Isoflavone gaben bei unseren Versuchen nach Spaltung des Heterocyclus aus dem A-Ring methoxylierte Phenole, aus dem B-Ring Phenylessigsäuren (184, 185). Erstere wurden wieder (bevorzugt nach Silylierung) massenspektroskopisch nachgewiesen. Der Zerfall dieser Verbindungen erfolgt durch Abspaltung einer CH_3 -Gruppe aus dem Silylrest und durch CD_3 -, CDO - und CD_2O -Eliminierung.

Beispiel: 1,3-Di-(trideuteromethoxy)-5-trimethylsilyloxy-benzol (Abb. 61, S. 104)



Die Massenspektren der persilylierten Phenylessigsäuren zeigten einerseits wieder typische CO_2 -Eliminierungen, andererseits Abbau zum Benzylkation durch Verlust der Silylestergruppierung. Beispiel: 3,4-Di-(trideuteromethoxy)-phenylessigsäure-trimethylsilylester (Abb. 62, S. 104)



Isomere Verbindungen können meist durch verschiedene Retentionszeiten und Massenspektren unterschieden werden. Dies wurde deutlich am Beispiel der beiden Aromaten 1,3-Di-(trideuteromethoxy)-5-trimethylsilyloxy-benzol und 1,2-Di-(trideuteromethoxy)-4-trimethylsilyloxy-benzol. Die zweite Verbindung spaltet primär CD_3 ab, die erste CD_2O .

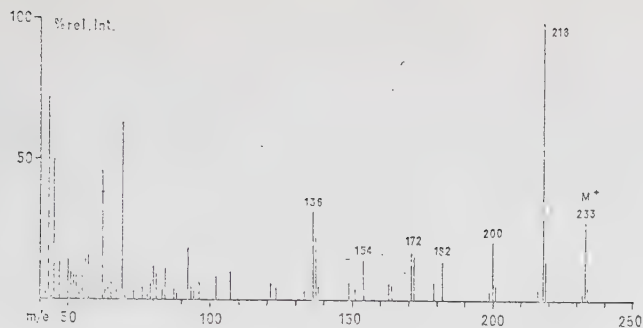


Abb. 59

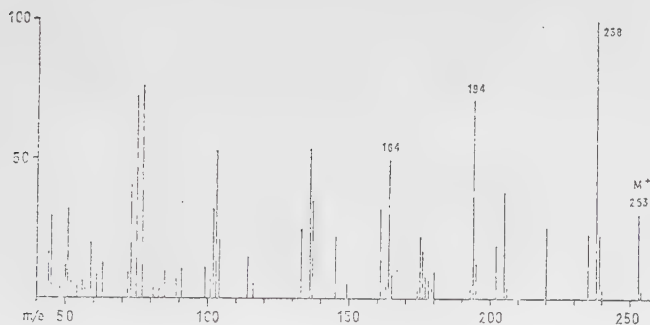


Abb. 60

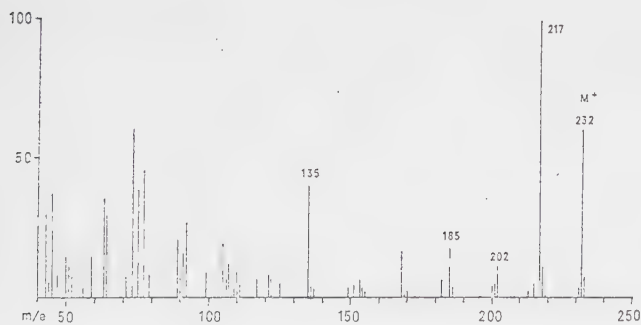


Abb. 61

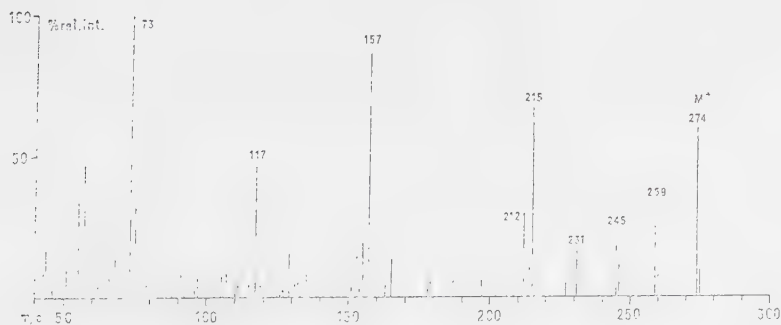
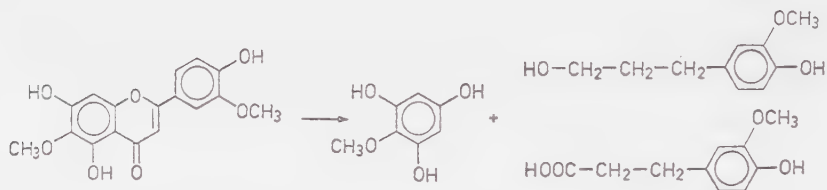


Abb. 62

2. Reduktiver Alkaliabbau

HURST und HARBORNE (186) haben Flavone mit Natriumamalgam im Alkalischen reduziert. Durch zwei-dimensionale DC konnten die Autoren die Abbauprodukte identifizieren. Diese Methode eignet sich im Gegensatz zum üblichen Alkaliabbau der Polyhydroxy-Flavonoide gut für den Mikromaßstab. Unter stark reduzierenden Bedingungen entstehen aus dem A-Ring die Phenole in guter und reproduzierbarer Ausbeute. Die labileren mehrwertigen Phenole werden jedoch auch bei dieser Methode unvollständig erhalten. Es finden auch unter Ausschluß oxidativer Agentien Abspaltungen von Hydroxylgruppen statt. So wurden z.B. keine Tetrahydroxyphenole erhalten. Neben Phloroglucin trat regelmäßig Resorcin auf.

Aus dem B-Ring erhält man die durch größere Stabilität ausgezeichneten Hydrozimtsäuren und Phenylpropanole. Unsere Versuche, diese Abbauprodukte durch GC-MS zu identifizieren, lieferten, wie am Beispiel des Flavons Jaceosidin gezeigt, gute Ergebnisse.



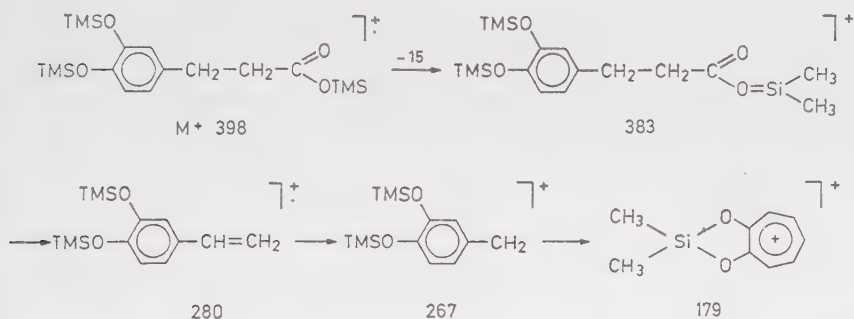
Die Abbauprodukte konnten nach Ausäthern underivatisiert über eine polare Polyester-Säule (187) gaschromatographisch getrennt werden. (Abb. 64a, S. 107).

Peak 1 wurde als 3-(4'-Hydroxy-3'-methoxyphenyl)-propanol-1 identifiziert. Die Alkohole sind massenspektroskopisch durch Wasserabspaltung erkennbar, worauf sich eine Äthylenabspaltung anschließt, so daß man zu einem stabilen Tropyliumkation gelangt.

Peak 2 war mit Hydroferulasäure identisch. Die Hydrozimtsäuren zeigten alle die Abspaltung von Ameisensäure, worauf wiederum das Tropylium-Kation als Base-Peak auftrat.

Peak 3 und Peak 4 wurden als Phloroglucin und Methoxy-phloroglucin identifiziert. Sie lieferten charakteristische Bruchstücke durch Methyl- und Carbonyl-Verlust. Da die Hydrokaffeesäure über GC nur schwer zu erfassen ist, war hier Silylierung angebracht. Die Abbauprodukte wurden in diesem Fall vor der Massenspektrometrie als Gemisch trimethylsilyliert und über eine Siliconummi-Phase GC-fractioniert.

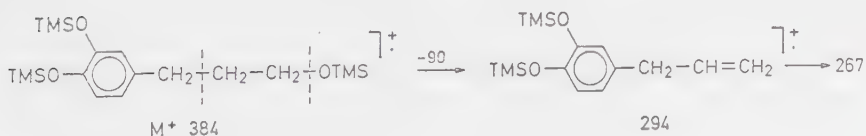
PTMS-Hydrokaffeesäure, die eine CO_2 -Eliminierung vermissen ließ, folgt einem anderen Zerfallsmechanismus als für Kaffeesäure beschrieben (183) (Abb. 63, S. 107).



3,4-Bis-(trimethylsilyloxy)-dihydrokaffeesäure-trimethylsilylester

Die Phenylpropylalkohole sind an starken M-90- und M-91 Peaks zu erkennen. Die Fragmentierung geht weiter bis zum Benzylkation (Abb. 64, S. 107).

Beispiel: 3,4-Bis-(trimethylsilyloxy)-phenyl-(1-trimethylsilyloxy)-propan



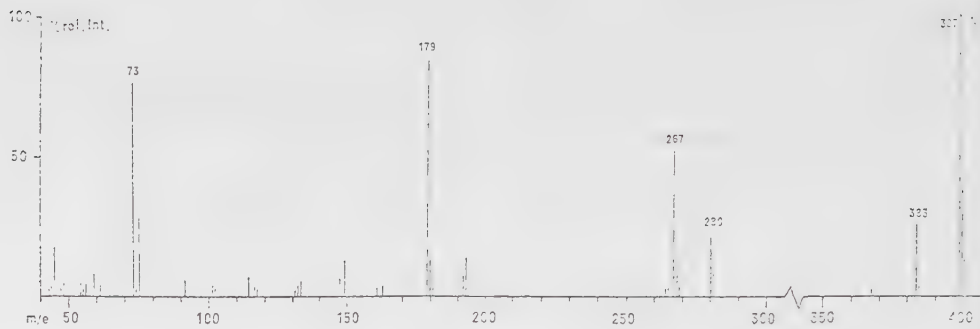


Abb. 63

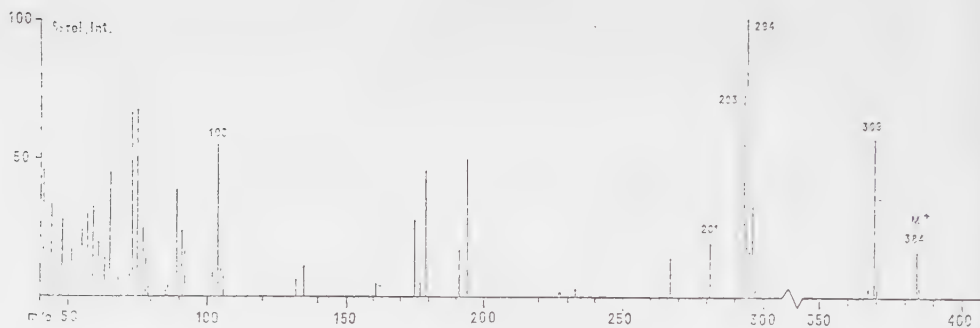


Abb. 64

- 1 = 3-(4'-Hydroxy-3'-methoxyphenyl)-propanol-1
- 2 = Dihydroferulasäure
- 3 = Methoxyphloroglucin
- 4 = Phloroglucin

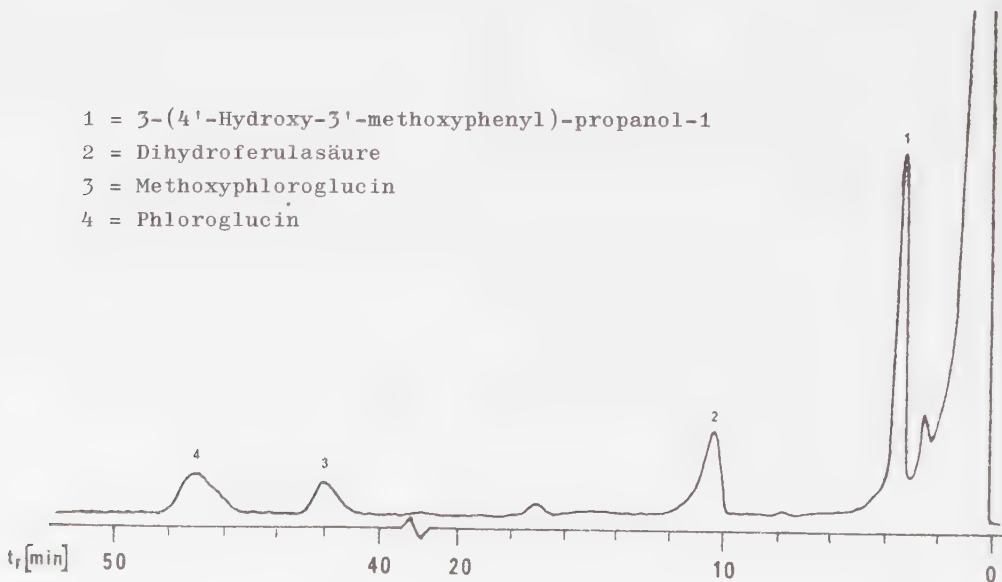
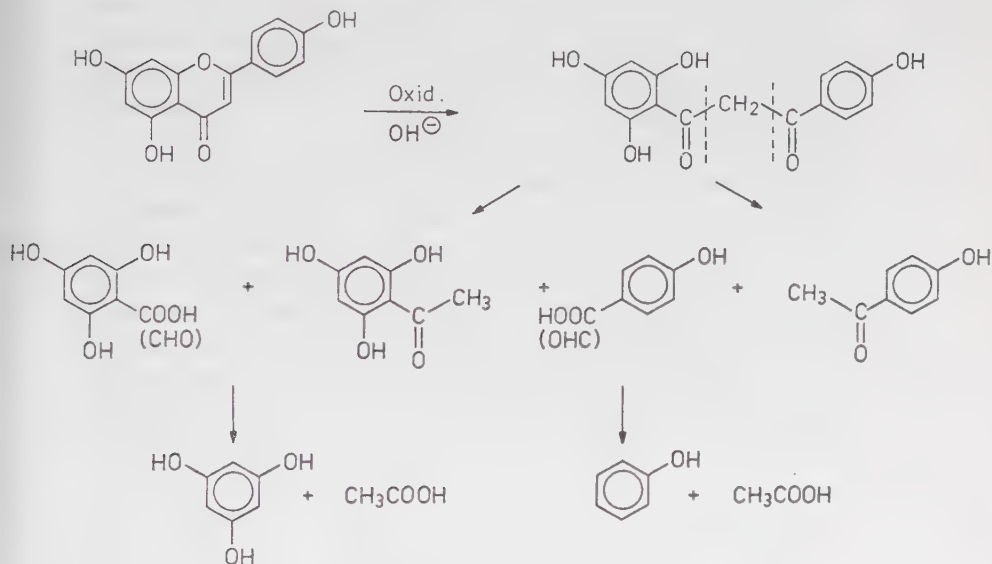


Abb. 64a

GC von Jaceosidin-Abbauprodukten (underivatisiert)
(2 m, 6x3 mm, 3% HI-EFF-8BP, 215⁰ isoth., 60 ml He/min)

3. Oxidativer Alkaliabbau

Ein oxidativer Alkaliabbau unter milden Bedingungen sollte bei Flavonen über das Dibenzoylmethan zu Säuren, Acetophenonen, Arylaldehyden und Phenolen führen.



Als Oxidationsmittel fanden bisher Luftsauerstoff (188), H_2O_2 (189) und Ozon (190) Verwendung. In Anlehnung an die in der Lignin-Chemie üblichen Abbaumethoden (191) verwendeten wir als milde Oxidantien Kupfer-II-sulfat und Nitrobenzol, wobei unter Schütteln in Miniautoklaven erhitzt wurde. Die Aufarbeitung der Produkte gestaltete sich schwierig, da bei Einsatz von Mikromengen zu viele Nebenprodukte auftraten. Die Ergebnisse erwiesen sich nicht immer als reproduzierbar. Die Phenolcarbonsäuren des Seitenphenyls waren meist gut zu identifizieren, weniger gut jedoch die Abbauprodukte des A-Ringes. Aldehyde konnten nur als Nebenprodukte erhalten werden.

Insgesamt kann man feststellen, daß auch der oxidative Abbau unter den von uns gewählten Bedingungen keine optimalen Ergebnisse liefert. Eine Derivatisierung der polyphenolischen Verbindungen zu per-(trideutero)-methylierten Produkten dürfte auch hier Vorteile ergeben.

VIII. Neue Inhaltsstoffe aus den Blüten von *Melaleuca quinquenervia*

1. Botanik und bisherige Anwendung

Der Kajeputbaum *Melaleuca quinquenervia* S.T. BLAKE, Myrtaceae - auch Weißbaum, Teebaum genannt - ist endemisch in Südostasien, Australien und Melanesien (192). Folia und Oleum Cajeputi werden dort seit langem als Volksarzneimittel verwendet (193). Der Baum wird in tropischen und subtropischen Gegenden auch häufig kultiviert. Die Gattung *Melaleuca* umfaßt ca. 100 Arten und steht der Gattung *Eucalyptus* systematisch nahe. Beide gehören zur Unterfamilie der Leptospermoideae (194). Unter der Sammelart *M. quinquenervia* faßt man neuerdings mehrere Abarten zusammen, die früher als selbständige Spezies unterschieden wurden und jetzt nur noch als Varietäten gelten: (*M. leucadendron* L.; *M. viridiflora* GAERTN.; *M. saligna* BLUME; *M. minor* SM; *M. cajeputi* ROXB.; *M. maidenii* BAKER; *M. smithii* BAKER; *Cajuputi leucadendra* RUSBY u.a.) (195, 196).

Diese überaus formenreiche Myrtaceen-Art wurde zur Kultivierung von Sumpfland und als Parkbaum z.B. in Indien, Zentralamerika und Florida eingeführt, wo sie teilweise auch verwildert vorkommt. Neben der wirtschaftlichen Nutzung des Holzes und der Rinde interessiert hier in erster Linie die pharmazeutische Anwendung. Junge Blätter und Samenkapseln finden Verwendung als Dekokte gegen Kopfschmerz und Erkältung. Vorwiegend aus den Blättern wird ein ätherisches Öl destilliert, das unter dem Namen Kajeputöl oder Teebaumöl offizinell ist. Die höchste Ausbeute an Öl (1.65%) wird aus den Blättern der Varietät *minor* erhalten. Das aus Neukaledonien stammende Niaouliöl der Varietät *viridiflora* wird davon unterschieden. In mehreren Pharmakopöen (Pharm. Helv. VI, Pharm. Française VIII, Pharm. Belge IV, Nederlandse Pharm. VI, Farmacopea Oficial Española IX, British Pharmaceut. Codex 1968 u.a.) ist das Öl neben dem chemisch ähnlichen Eucalyptusöl offizinell.

Dem Kajeputöl wird antiseptische und analgetische Wirkung zugeschrieben. Es soll ferner vermifuge und germicide Wirkung haben. Äußerlich wird es als Rubefaziens und Spasmolytikum angewendet. In tropischen Ländern gilt es als Stechmücken-Repellens und als Heilmittel gegen verschiedene Hautkrankheiten, Halsentzündungen und dergl. Die flüchtigen Bestandteile aus Blatt und Blüte sollen in Malariagegenden antiseptisch wirken. Andererseits wirken Ölbestandteile oder Pollen blühender Bäume irritierend und allergisierend auf die Atmungsorgane, besonders wenn sich Kajeputbäume in unmittelbarer Nähe von Behausungen befinden. Sie führen bei entsprechender Disposition zu heufieberähnlichen Symptomen. Da nur die leicht zu gewinnenden Blätter reichlich ätherisches Öl enthalten, ist die Blütendroge bisher nicht untersucht worden. Die kleinen Myrtaceen-Einzelblüten besitzen lang vorstehende Staubblätter und sitzen an den verholzten Achsen der zahlreichen ährenförmigen Infloreszenzen (Abb. 65).



Abb. 65

Blütenzweig und Einzelblüte von *Melaleuca quinquenervia*

2. Bisherige chemische Untersuchungen

Die Myrtaceen-Familie gehört hinsichtlich des ätherischen Ölgehaltes zu den am intensivsten bearbeiteten Familien des Pflanzenreichs (197,198). Das trifft auch auf die ätherischen Öle der Melaleuca-Arten zu. Im "GILDEMEISTER-HOFFMANN" (199) werden ätherische Öle von ca. 30 Melaleuca-Arten bzw. Varietäten beschrieben. Im "GUENTHER" (200) sind 6 verschiedene Melaleuca-Öle aufgeführt. Auch "HEGNAUER" (201) zählt Melaleuca-Öle von 8 verschiedenen Chemotypen auf.

Monoterpene und Sesquiterpene sind die Hauptbestandteile der Öle(202). Cineol ist in den meisten Ölen zu 35-65% enthalten, daneben u.a. α -Pinen, l-Limonen, α -Terpineol, Linalool, Nerolidol und Aromadendren.

Phenylpropan-Bestandteile werden verhältnismäßig selten angetroffen. Nur von einem Öl aus Melaleuca leucadendron wird berichtet, daß es ca. 80% Methyleugenol enthält (201). Charakteristisch für viele Myrtaceen-Öle sind Phloroglucinderivate, die häufig C-methyliert sind und auch in der Ketoform vorliegen können.

Für die Tendenz zur Bildung stark alkylierter Polyphenole gibt es bei den Myrtaceen viele Beispiele: Baeckeol aus Baeckea crenulata (197), Torquaton aus Eucalyptus torquata (203), Grandifloron aus Leptospermum flavescens (204), sowie Chromone vom Typ des Eugenitins bzw. Angustifolionols (205), um nur einige zu nennen.

Aus dem Kajeputöl wurde von LOWRY (206) ein 3,5-Dimethyl-4,6-di-O-methyl-phloracetophenon isoliert, aus Eucalyptus- und Angophora-Arten wurden die methylierten Flavone und Flavanone Eucalyptin (207), Sideroxylin (208), Farrerol (209), Angophorol (210) und Demethoxymatteucinol (211) u.a. gewonnen.

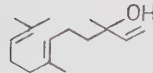
Benzophenone wurden aus der Melaleuca nahestehenden Gattung Leptospermum beschrieben (212) (Abb. 66, S. 112).



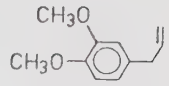
1,8-Cineol



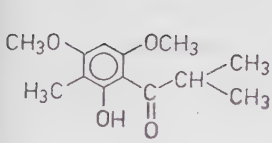
α -Pinen



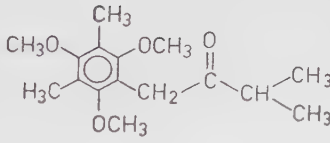
Nerolidol



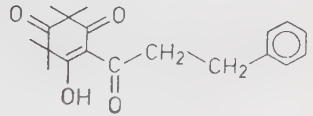
O-Methyleugenol



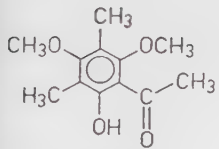
Baeckeol



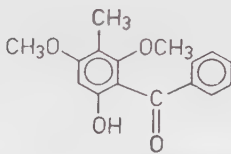
Torquaton



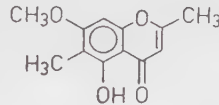
Grandifloron



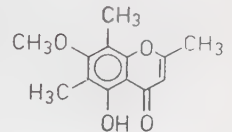
Kajeput-
Phloracetophenon



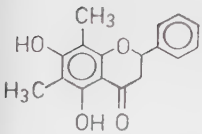
Leptospermum-
Benzophenon



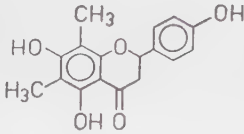
Eugenitin



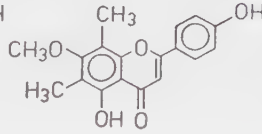
Angustifolionol



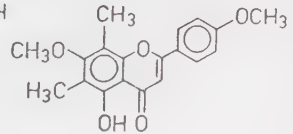
Desmethoxy-
Matteucinol



Farrerol



Sideroxylin



Eucalyptin

Abb. 66

Typische Myrtaceen-Inhaltsstoffe

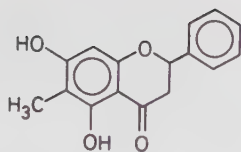
In Melaleuca-Arten sind Flavonoide bisher nicht nachgewiesen worden. Während Stilben- (213) und Flavonoidglykoside, wie z.B. Hemiphloin(214), seltener vorzukommen scheinen, sind die Myrtaceen reich an Gallussäure, Ellagsäure, Catechinen, Leucoanthocyanen und davon abgeleiteten Gerbstoffen (215). Sie wurden aus Blättern, Blattwachs, Rinde und Kino isoliert.

Reichlich werden auch Triterpenoide gebildet. Aus der Borke von 6 *Melaleuca*-Arten wurden Melaleucin (216) (identisch mit Betulinsäure) und Melaleucinsäure (217,218) - zwei pentacyclische Triterpensäuren- isoliert. In einer kürzlich erschienenen Arbeit wird über neutrale Triterpene aus Blättern und Stielen berichtet (219): Sitosterol, Friedelin, Betulin, Uvaol, Taraxeron, Taraxastenon, epi-Taraxerylacetat. (Abb. 67, S. 114).

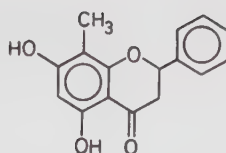
In einer orientierenden Voruntersuchung wurde in unserem Arbeitskreis festgestellt, daß die Blüten von *Melaleuca quinquenervia* (Dez. 1967 in Florida gesammelt) neben den Flavanonen Kryptostrobin und Strobopinin (220, 221) weitere Polyphenole unbekannter Struktur enthalten. Außerdem konnten einige Triterpensäuren, darunter Betulinsäure, Ursol- und Oleanolsäure isoliert und identifiziert werden. Zur Abtrennung der Säuren von den Begleitstoffen wurde der Chloroformextrakt mit NaOH-alkalischer Lösung ausgeschüttelt. Dabei fielen die oben erwähnten Flavanone als Gemisch an. Durch Säulenchromatographie wurde dieses in zwei Fraktionen S I und S II getrennt. S I erwies sich noch als ein 3:2-Gemisch aus Kryptostrobin und Strobopinin.

Bei einer zweiten DC-Untersuchung ergab ein methanolischer Extrakt aus *Melaleuca*blüten (im Juni 1974 in Florida gesammelt) ebenfalls Hinweise auf das Vorliegen phenolischer Inhaltsstoffe. Sie ließen sich mit Echtblausalz oder Fe-III-chlorid anfärben. In den Chloroformauszügen waren Verbindungen nachweisbar, die sich chromatographisch wie Strobopinin und Kryptostrobin verhielten.

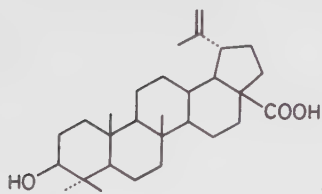
Die Substanz S II war aber in dieser Drogencharge nicht aufzufinden. Statt dessen war eine dritte Substanz S III mit etwas geringerem R_f -Wert nachweisbar. Wir gaben dieser Verbindung den Trivialnamen Melanervin, Verbindung S II bezeichnen wir als Isomelanervin.



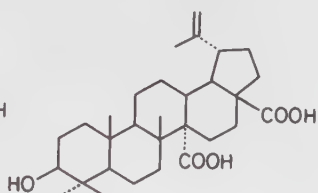
Strobopinin



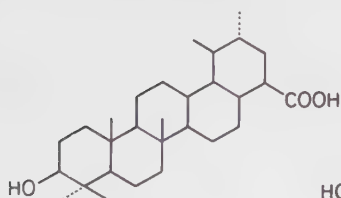
Kryptostrobin



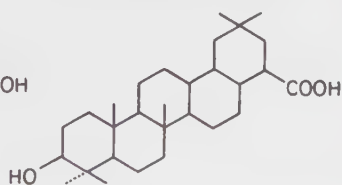
Betulinsäure



Melaleucinsäure



Ursolsäure



Oleanolsäure

Abb. 67

Melaleuca-Inhaltsstoffe

3. Isolierung und Strukturaufklärung von Melanervin

Zur Isolierung der Verbindungen S I und S III wurde die Droge mit Chloroform extrahiert und der Trockenextrakt mit Petroläther wiederholt digeriert, um das Chlorophyll zu entfernen. Durch Ausschütteln mit wässrigem Alkohol wurden die Triterpensäuren abgetrennt und das Roh-Melanervin erhalten. Durch wiederholtes Umkristallisieren oder durch Säulenchromatographie an Kieselgel konnten Strobopinin und Kryptostrobin von Melanervin abgetrennt werden. Aus Äthanol-Chloroform wurde Melanervin als Äthanolat vom Smp. 164° , aus Benzol oder DMSO- CHCl_3 ein solvensfreies Melanervin vom Smp. 193° erhalten (siehe Isolierungsschema Abb. 68, S. 116).

Die R_f -Werte auf Polyamid- und Kieselgel-Schichten sind aus Abb. 69, S. 117, ersichtlich.

Als Laufmittel fanden die Systeme Methanol (für Polyamid), Benzol-Pyridin-Ameisensäure 36:9:5 und Dichloräthan-Äthylacetat-Eisessig 8:1:1, sowie Äther-Benzin-Aceton 5:5:1 Verwendung. Als Detektionsmittel dienten Echtblausalz, Eisen-III-chlorid, Folin-Ciocalteu-Reagenz und Gibbs-Reagenz. Durch Besprühen mit 2,6-Dichlorchinonchlorimin ließen sich Kryptostrobin grün und Strobopinin grün-violett, Melanervin und Isomelanervin gelbbraun anfärben.

Nach dem chromatographischen Verhalten konnte ein Glykosid ausgeschlossen werden.

Das UV-Spektrum von Melanervin (Abb. 70, S. 118) zeigte 2 Maxima bei 298 und 337 nm und damit Ähnlichkeit mit den Spektren von Flavanonen. Gegenüber dem Strobopinin war das UV-Spektrum um 6 nm bathochrom verschoben. Die bei Flavanonen auftretende Schulter bei 335 nm war hyperchrom verändert. Die Verschiebungen mit den üblichen Shift-Reagenzien NaOMe und AlCl_3 waren analog (Bande II) den Flavanon-Spektren.

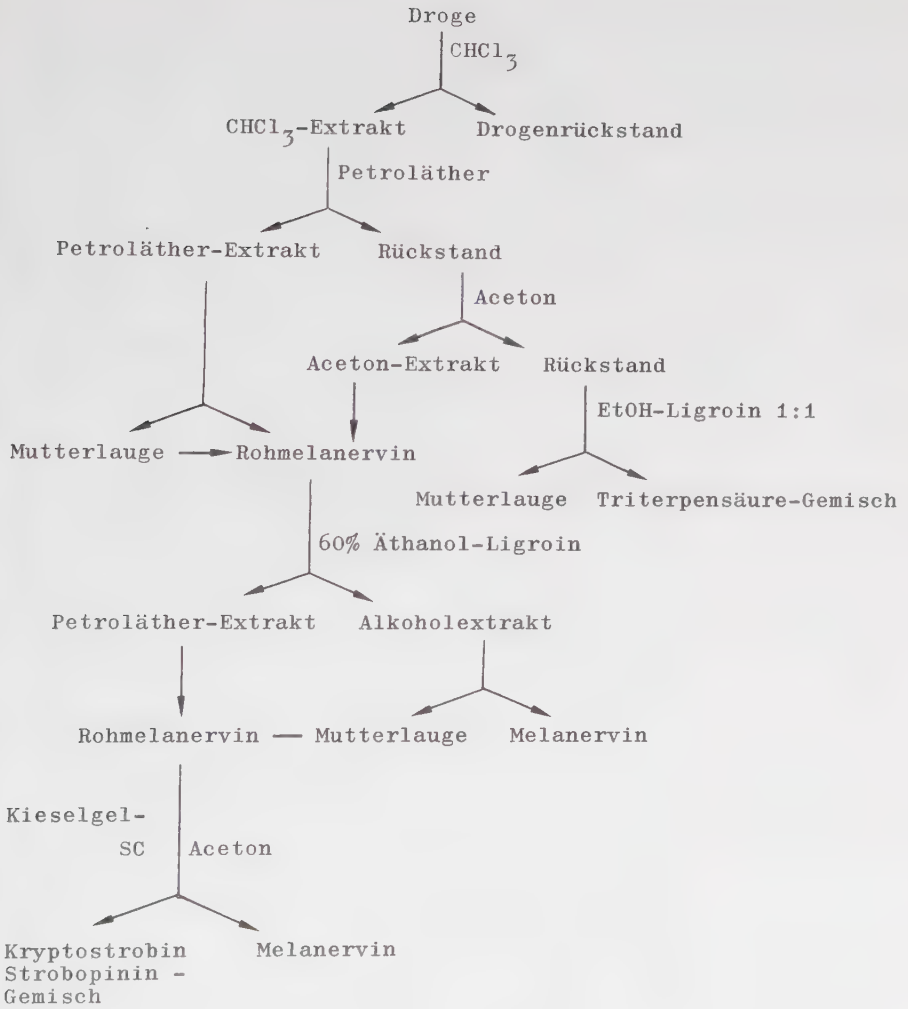
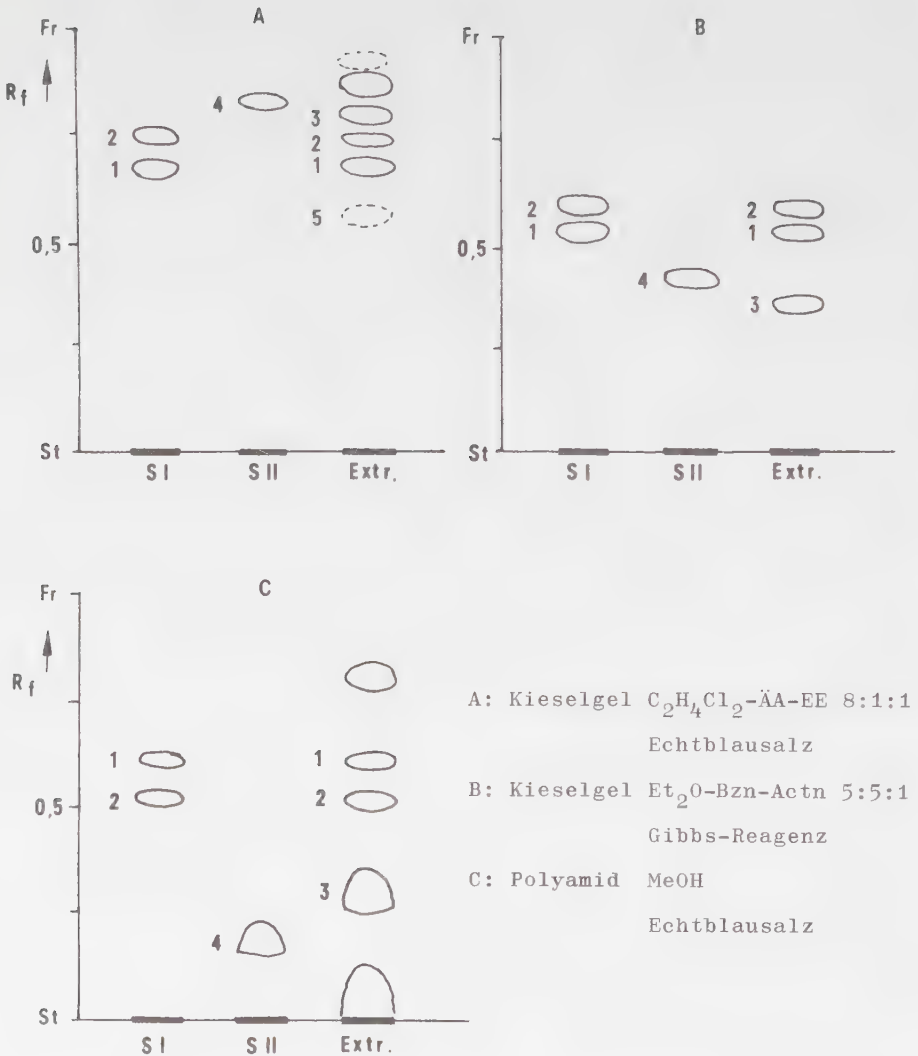


Abb. 68

Isolierungs-Schema für Melanervin



- 1 Kryptostrobin: A 0.68 rot B 0.51 grün C 0.60 purpur
 2 Strobopinin: A 0.77 rot B 0.56 grünviol. C 0.53 purpur
 3 Melanervin: A 0.79 rotbraun B 0.35 hellbr. C 0.33 violett
 4 Isomelanervin: A 0.81 rotbraun B 0.40 hellbr. C 0.20 violett

Abb. 69

DC der Chloroformextrakte von *Melaleuca quinquenervia*

	Strobopinin	Melanervin
NaOAc-Shift:	38 nm	39 nm
NaOMe-Shift:	35 nm	40 nm
AlCl ₃ -Shift:	24 nm	21 nm

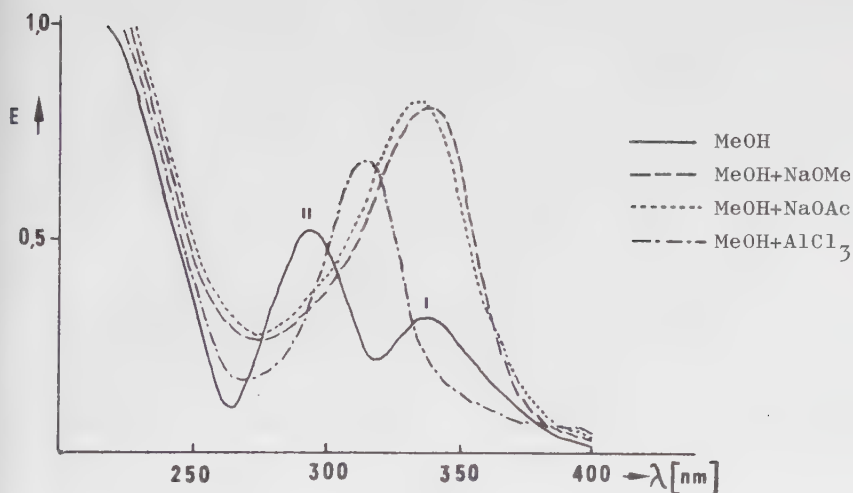


Abb. 70

UV-Spektren von Melanervin

Da mit H_3BO_3 keine Verschiebung der Banden I und II zu beobachten war, sollten ortho-Dihydroxy-Gruppierungen abwesend sein. Auffallend waren die Veränderungen des UV-Spektrums bei Änderung der Substanz-Konzentration. In verdünnter Lösung wurde das Maximum bei 337 nm hyperchrom, das bei 298 nm hypochrom verschoben. Bei Konzentrationserhöhung wurde das Maximum bei 298 nm in seiner Intensität verstärkt, während sich das Maximum bei 337 nm hypsochrom veränderte. Möglicherweise ist hierfür eine Änderung des chromophoren Systems durch Cyclisierung bzw. Ringöffnung in einem Flavanon-Chalkon-Gleichgewicht verantwortlich zu machen.

Die IR-Spektren in KBr unterschieden sich voneinander je nach dem Gehalt an Kristallsolvat. Bei Trocknung des Alkoholats im HV/120° lieferte es ein identisches IR-Spektrum mit der aus Benzol kristallisierten Substanz (Abb. 71). In beiden Spektren sind typische Aromatenbanden erkennbar (692, 725, 750, 763, 800 cm^{-1}). Die starke Bande bei 692 cm^{-1} ist charakteristisch für einen unsubstituierten Phenylrest.

Die C=O-Bande bei 1618 cm^{-1} liegt in einem Bereich, in dem die C=O-Gruppe eines Flavanons absorbiert (1620 cm^{-1} für Kryptostrobin, 1625 cm^{-1} für Strobopinin). Intensive Banden traten bei 1115 cm^{-1} auf. Die OH-Gruppen zeigten chelatisierte und assoziierte H-Brücken-Bindungen an.

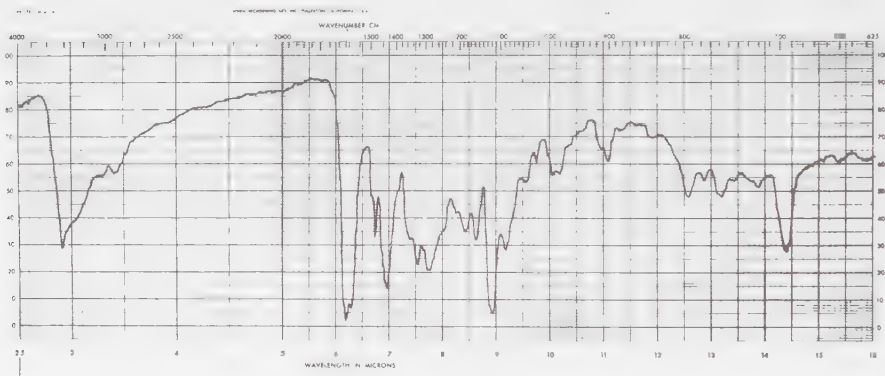


Abb. 71

IR-Spektrum von Melanervin

Das NMR-Spektrum (Abb. 72, S. 120) zeigt die für Flavanone typischen Multipletts bei $\delta = 5.45$ und δ ca. 3 ppm für die H-2 und H-3-Protonen im heterocyclischen Ring. Nimmt man das Strobopininspektrum zum Vergleich, so findet man mit praktisch gleicher chemischer Verschiebung eine Phenylgruppe bei $\delta = 7.25$ ppm und eine Aryl-CH₃-Gruppe bei $\delta = 1.96$ ppm. Ein Signal bei $\delta = 1.93$ ppm ließ sich einer weiteren Methylgruppe am Aromaten, ein anderes bei $\delta = 5.71$ ppm einer Methoxygruppe und ein weiteres bei $\delta = 7.08$ ppm einer zweiten Phenylgruppe zuordnen.

Von den beiden Singulettis im Bereich aromatischer Protonen war dasjenige bei $\delta = 6.16$ ppm mit $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{D}$ langsam austauschbar. Es müßte demnach acide Eigenschaften haben. Außerdem ließen sich 4 OH-Gruppen austauschen, darunter eine in peri-Stellung zum C-4-Carbonyl.

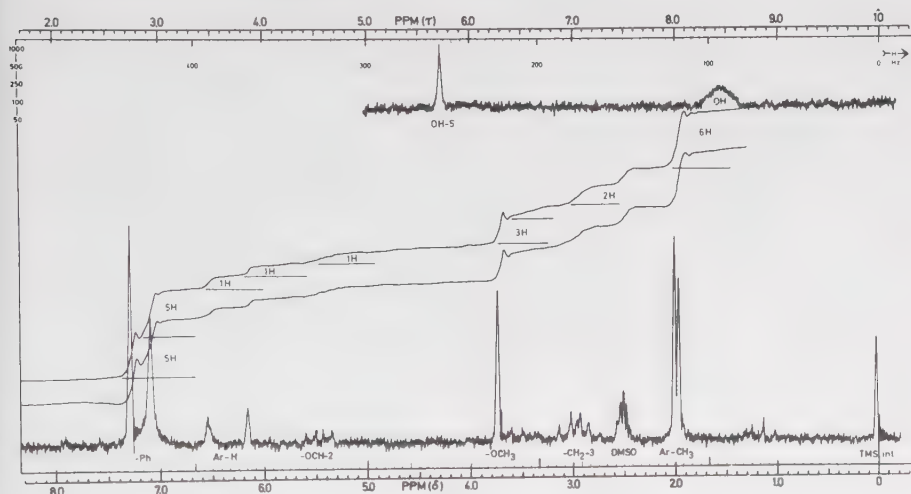


Abb. 72

NMR-Spektrum von Melanervin

Der Molekülpeak bei m/e 512 im Massen-Spektrum hatte für eine aromatische Verbindung eine überraschend geringe Intensität. Wir erhielten ihn nur durch schonendes Verdampfen im Direkteinlaß. Die intensitätsstarken Peaks bei 270 und 241 m/e weisen darauf hin, daß das Molekül sehr leicht in zwei Teile fragmentiert. Die Bruchstückbildung dieser und anderer Schlüsselfragmente ist aus dem Schema (Abb. 74, S.121) ersichtlich. Der intensive Peak m/e 154 ergänzt sich mit m/e 358 zum Molekül-Ion. Die Masse m/e 270 entspricht der eines Methylpinocembrins (6-bzw. 8-C-Methyl-5,7-dihydroxy-flavanon). Der verbleibende Rest $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{O}_3$ könnte sich nach dem NMR-Spektrum aus den Teilstrukturen m/e 91 und 154 zusammensetzen. (Massenspektrum Abb. 73, S. 121).

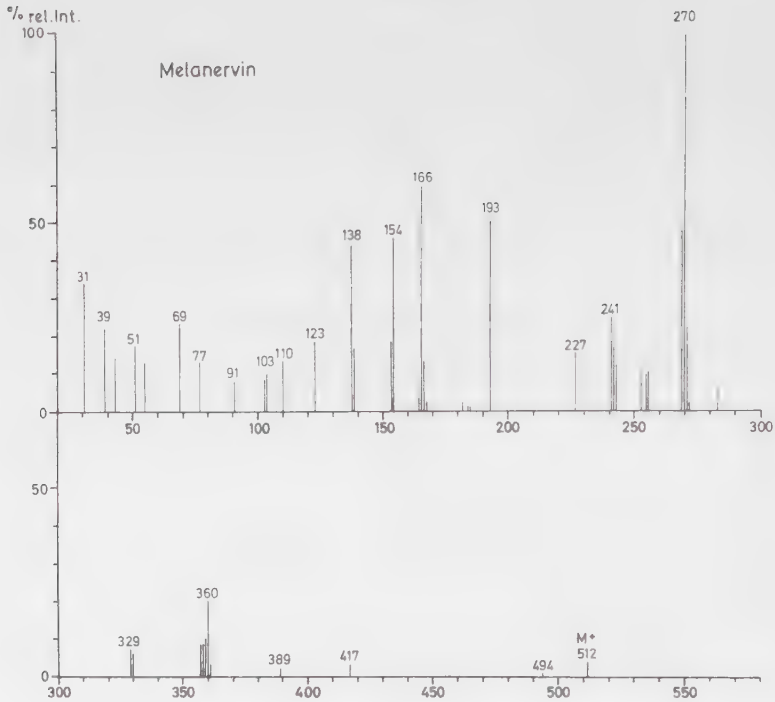


Abb. 73
MS von Melanervin

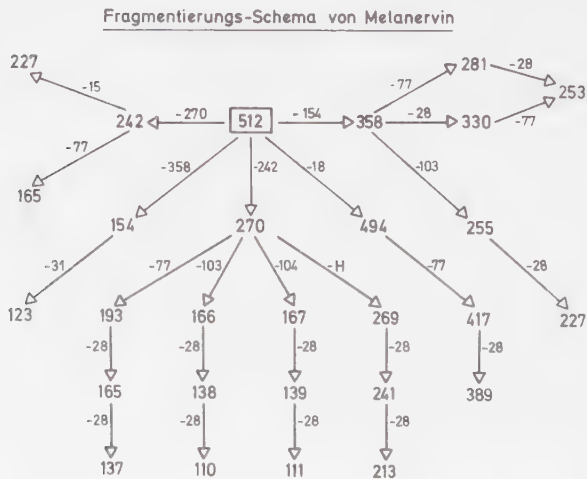


Abb. 74
Zerfallschema von Melanervin

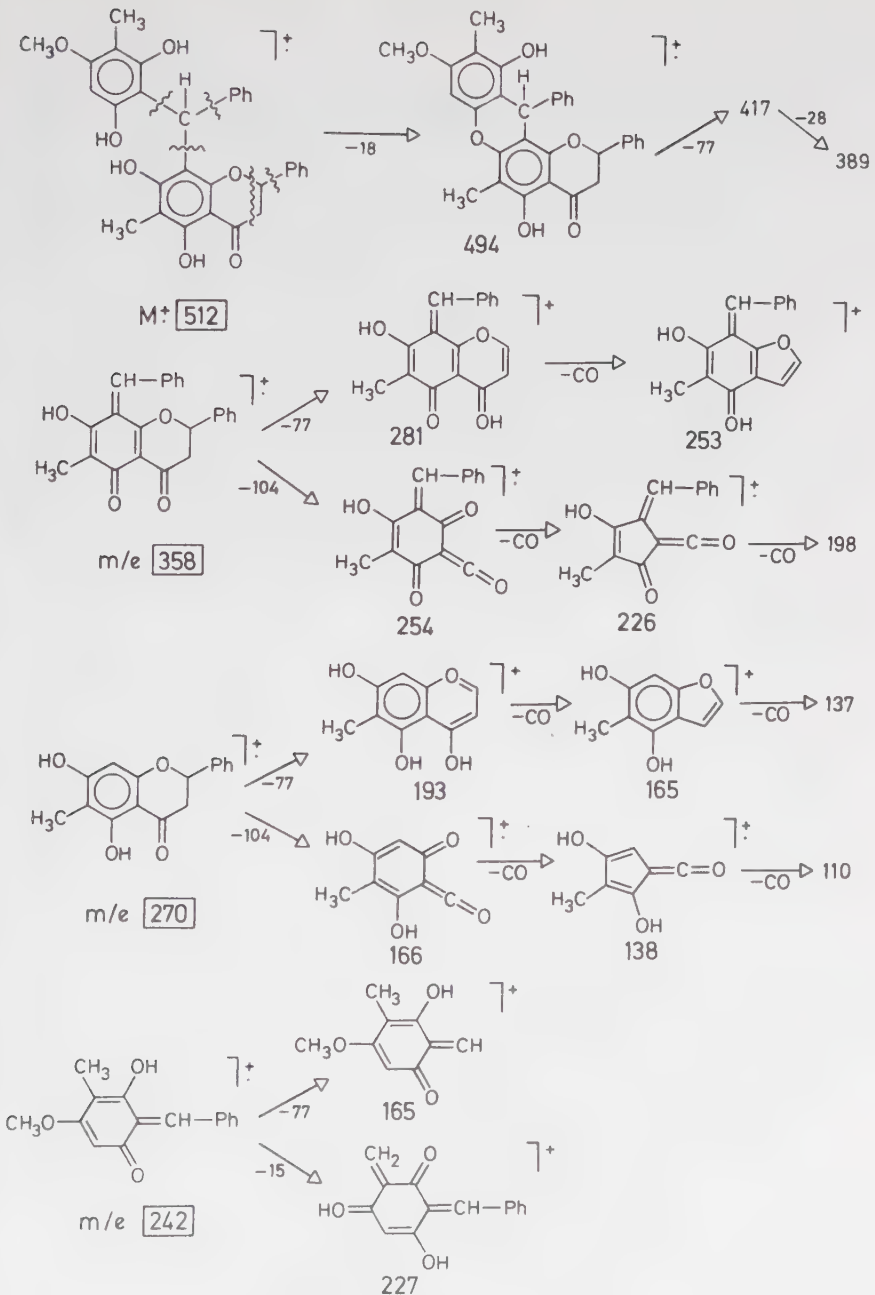
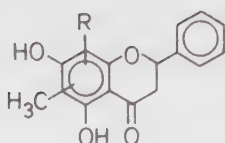


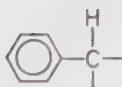
Abb. 75

Schlüsselfragmente von Melanervin



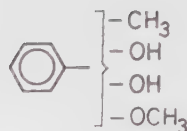
m/e 270

R = H



m/e 91

R = 91 + 154 mu



m/e 154

Typisch für das Spektrum ist die Bruchstückbildung mit und ohne H-Wanderung. Im Schema Abb. 75, S.122, sind mögliche Fragmente formuliert, wie sie durch Prototropie entstehen können. Hierbei wird die postulierte Struktur vorweggenommen. Nach den bis dahin vorliegenden spektroskopischen Befunden kann das Substitutionsmuster aus den obigen Teilstrukturen allein nicht abgeleitet werden.

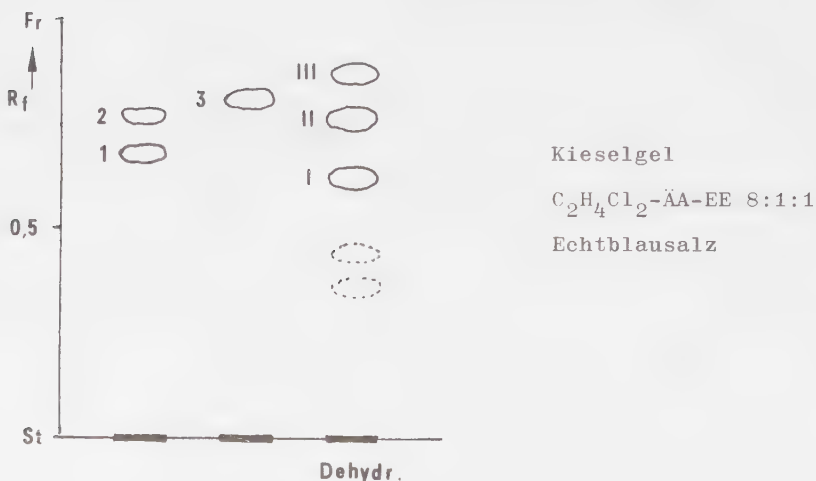


Abb. 76

DC der Dehydrierungsprodukte von Melanervin

1 = Kryptostrobin 0.68 rot

2 = II=Strobopinin 0.76 rot

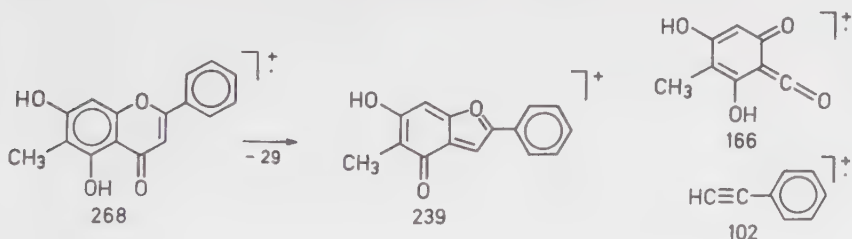
3 = Melanervin 0.80 rotbraun

I = Strobochrysin 0.61 orange

III = Dehydro-Melanervin 0.85 orange

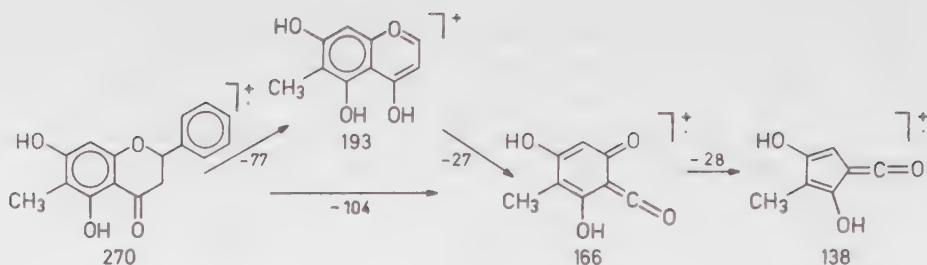
Da eine zum Flavon dehydrierte Verbindung z.B. durch aufgehobene Chiralität und einen veränderten Chromophor im Heterocyclus zusätzliche Informationen erwarten ließ, wurden Versuche unternommen, Melanervin mit verschiedenen Reagenzien zu dehydrieren. Ansätze mit Selendioxyd (222) bzw. N-Bromsuccinimid (223,224) führten zu keinen befriedigenden Ergebnissen. Die Dehydrierung nach SESHADRI (225) mit Jod-Kaliumacetat ergab als Dehydrierungsprodukt ein Gemisch, das über präparative DC-Platten getrennt wurde. Es wurden 3 Zonen erhalten (Abb. 76, I - III, S. 123)

Die Zone I ($R_f = 0.61$) ergab nach Elution eine Verbindung, die sich im UV- und Massenspektrum in charakteristischer Weise vom Strobopinin unterschied. Die Molekülmasse von m/e 268 und die Hauptfragmente bei 239, 166, 102 wiesen auf ein Flavon, nämlich das Dehydro-Strobopinin oder Strobochrysin (226) hin.



Das NMR-Spektrum in $CDCl_3$ mit den Signalen $\delta = 7.70 - 8.00$ ppm (m) für H-2',6', $\delta = 7.32 - 7.55$ (m) für H-3',4',5'; 6.79 (s) für H-8 und $\delta = 6.47$ (s) für H-3 bestätigte die Flavon-Struktur.

Die Hauptkomponente, Zone II, $R_f = 0.76$ zeigte mit Strobopinin gleichen R_f -Wert und gleiche Anfärbereaktion. Aus der Platte entnommen, ergab sie einen Molekülpeak von m/e 270 mit den typischen Bruchstücken 193, 166, 138, 104, 103 mu.



Auch das IR-Überlagerungsspektrum dieser Verbindung zeigte gute Kongruenz mit Strobopinin.

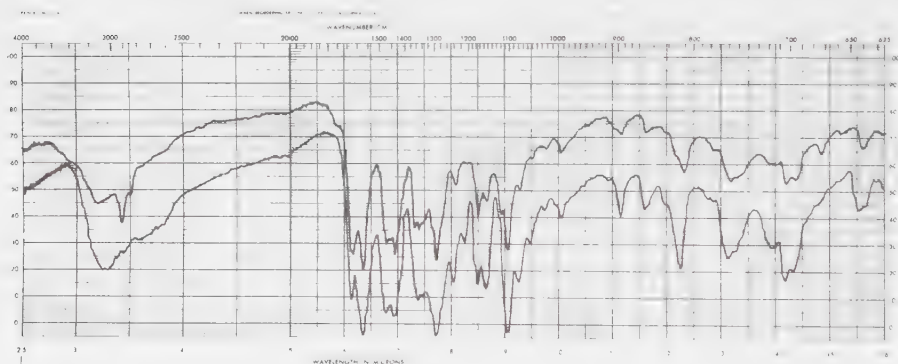


Abb. 77

IR-Überlagerungsspektrum von Strobopinin

Bei Zone III ($R_f = 0.85$) handelte es sich um Dehydro-Melanervin. Im UV-Spektrum (Abb. 78, S. 126) war es nämlich nahezu deckungsgleich mit Strobochrysin, sodaß ein 2,3-Dehydroflavanon als Chromophor vorliegen mußte (227,228). Das MS bestätigte diese Annahme durch Peaks bei 510, 415, 268 mu. Wir hatten aber nicht genug reines Produkt, um weitere Untersuchungen durchzuführen.

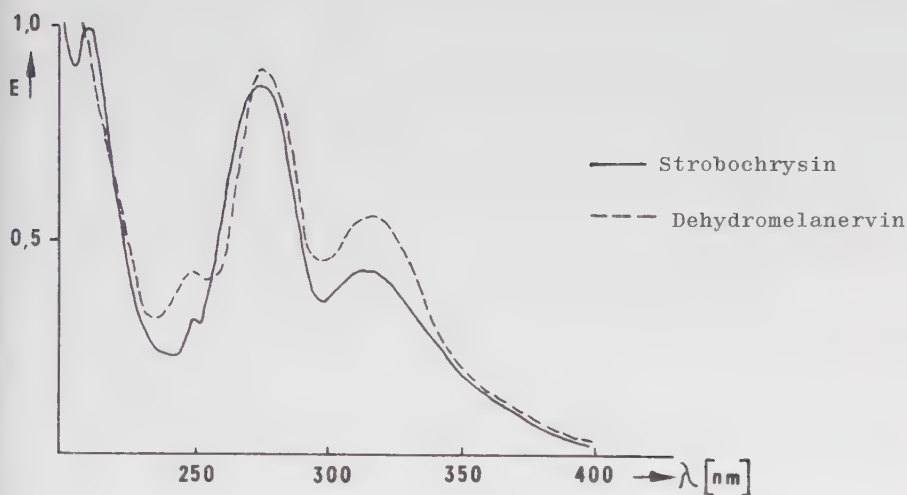


Abb. 78

UV-Spektrum von Strobochrysin und Dehydromelanervin

Die Dehydrierungsprodukte lieferten den Beweis, daß im Melanervin ein Methylpinocembrin-Gerüst vorlag. Da neben dem Strobochin das isomere Kryptostrobin nicht gefunden wurde, ist eine Verknüpfung des Restes R = 242 mu in 8-Position wahrscheinlich, wenngleich eine Isomerisierung während der Dehydrierung nicht ganz ausgeschlossen werden kann.

Um den Substitutionstyp des Restes R zu klären, wurden Abbauversuche mit 2 N NaOH (168) unternommen. Die erhaltenen Spaltprodukte wurden dünnschichtchromatographisch bzw. durch GC getrennt und mit Hilfe von Testsubstanzen spektroskopisch identifiziert. Die DC ergab folgende Spaltprodukte:

Phloroglucin, Methylphloroglucin, Benzoessäure und Zimtsäure, ein weiteres Phenol X und zwei zusätzliche fluoreszierende Flecke (Abb. 79, S. 127).

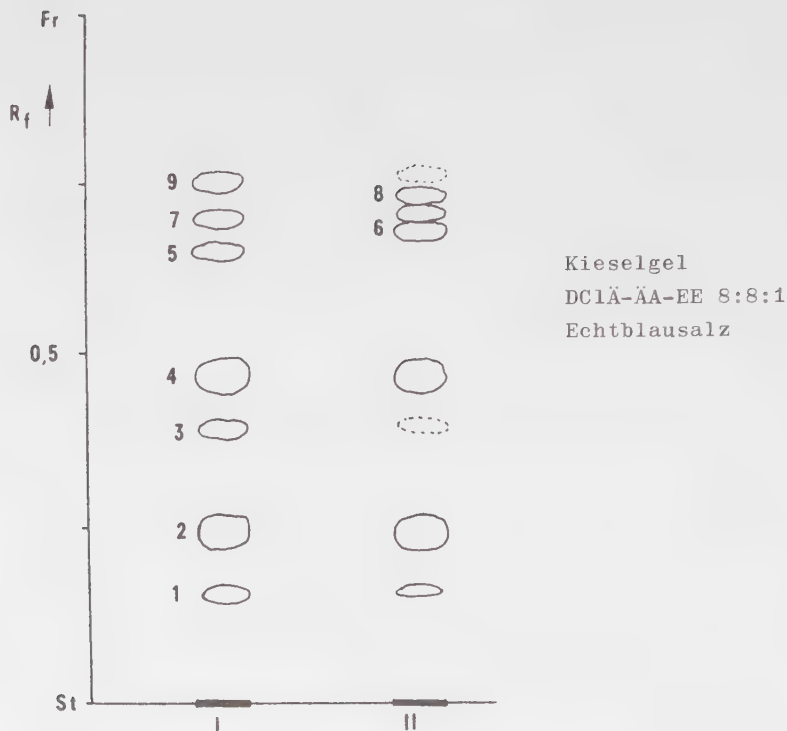


Abb. 79

DC der Alkali-Abbauprodukte

I = Alkali-Abbau

II = reduzier. Alkali-Abbau

1 = Phloroglucin 0.16 violett

2 = Methylphloroglucin 0.25 violettbraun

3 = Methylphloracetophenon 0.40 orange, Fluoresz. UV 360

4 = Phenol X 0.48 rotbraun

5 = Zimtsäure 0.66 farblos

6 = 3-Phenylpropanol-1 0.67 farblos

7 = Benzoessäure 0.69 farblos

8 = Hydrozimtsäure 0.73 farblos

9 = Melanervinacetophenon 0.75 orange, Fluoresz. UV 360

Die Identifizierung der Verbindungen wurde wie folgt durchgeführt:

Phloroglucin stimmte in der Cochromatographie und GC-MS im R_f -Wert und in der Retentionszeit des PTMS-Äthers mit der Testsubstanz überein (Abb. 80, Peak 6). Das MS ergab als wesentliche Peaks m/e 126 M^+ , 111, 97, 85, 80, 69, 52.

Methylphloroglucin wurde dünnschichtchromatographisch durch MS und durch GC-MS des TMS-Derivats mit einer synthetischen Verbindung verglichen (Abb. 80, Peak 7). Außerdem wurde es über Kieselgel-Platten isoliert und ein NMR- und IR-Überlagerungsspektrum angefertigt (Abb. 81, S. 129).

Zimtsäure und Benzoessäure wurden ebenfalls gaschromatographisch (Abb. 80, Peak 1 und 4) und durch ihre Massenspektren ermittelt. Fragmente: 148 M^+ , 131, 103, 91, 77 und m/e 122 M^+ , 105, 77, 51.

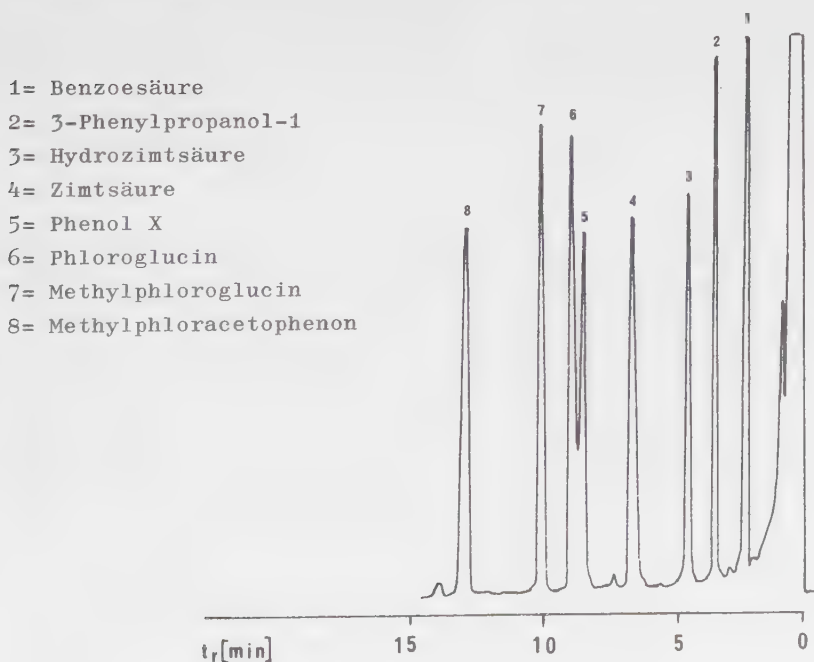


Abb. 80

GC der NaOH-Abbauprodukte als PTMS-Derivate
 (2 m, 6x3 mm, 10% UCCW-982, 140 - 250°, 5°/min, 50 ml He/min)

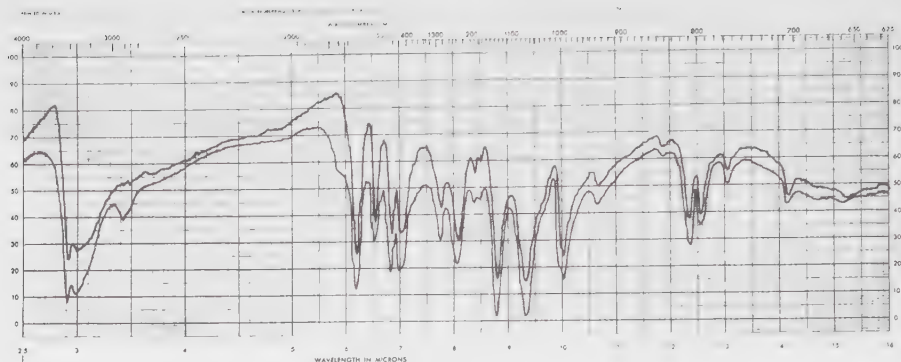


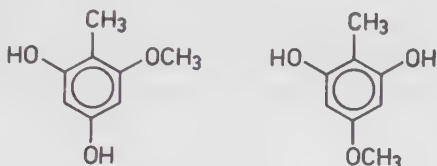
Abb. 81

IR-Überlagerungsspektrum von Methylphloroglucin

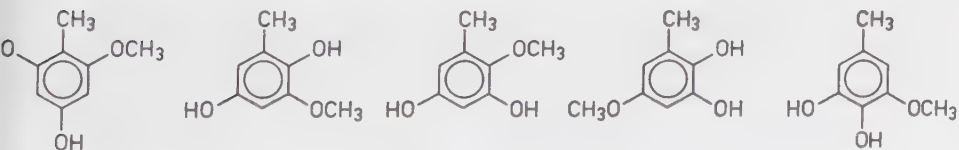
Ein zweiter alkalischer Abbau unter reduzierenden Bedingungen mit Natriumamalgam (186) führte u.a. zu Benzoessäure und Hydrozimtsäure, ferner 3-Phenylpropanol-1. Die Retentionszeiten und Massenspektren dieser Verbindungen konnten ebenfalls durch Testsubstanzen bestätigt werden (Abb. 80, Peak 2 und 3).

In dem Phenolgemisch war neben Methylphloroglucin als Hauptmenge ein Phenol vom MG 154 enthalten (Abb. 80, Peak 5, S. 128). Diese Masse, die auch einem intensiven Peak im Melanervin-MS entsprach, ließ ein Dihydroxy-methoxy-toluol vermuten. Zur Klärung der Substitution versuchten wir zunächst, einen Permethylläther zu erhalten. Nach Methylierung mit CH_3J (229) resultierte ein Produkt der Molekülmasse 182. Es war mit synthetischem 2,4,6-Trimethoxytoluol identisch. Die Identität ergab sich aus GC (Ret.Zeit Abb. 97, S. 145), NMR- und IR-Spektrum.

Von den 16 möglichen isomeren Trihydroxytoluolmonomethyläthern blieben somit nur noch die mit Phloroglucinstruktur übrig, d.h. 2,6-Dihydroxy-4-methoxy-toluol (sog. Methylphloroglucin- α -monomethyläther) und 2,4-Dihydroxy-6-methoxy-toluol (Methylphloroglucin- β -monomethyläther).



Zur weiteren Aufklärung wurde das NMR-Spektrum angefertigt (Abb. 82, S. 131). Es zeigte 2 Dubletts für aromatische Protonen bei $\delta = 5.92$ und 6.05 ppm mit einer m-Kopplung, außerdem OCH₃- und Ar-CH₃-Gruppen, sowie 2 phenolische OH-Gruppen. Unter Berücksichtigung der meta-ständigen, nicht äquivalenten Protonen müssen von den 16 möglichen Isomeren alle mit ortho- und para-ständigen Protonen und mit symmetrischer Substitution ausscheiden. Es verbleiben somit folgende Strukturen:



Die Ergebnisse aus NMR und Methylierung ließen zweifelsfrei die Annahme zu, daß das Phenol X mit 2,4-Dihydroxy-6-methoxy-toluol identisch ist.

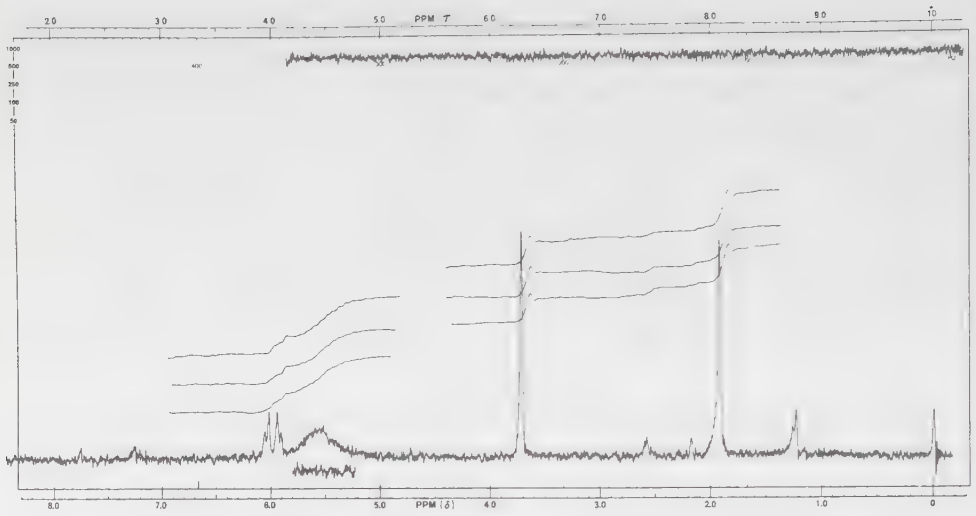


Abb. 82

NMR-Spektrum von Methylphloroglucin- β -methyläther

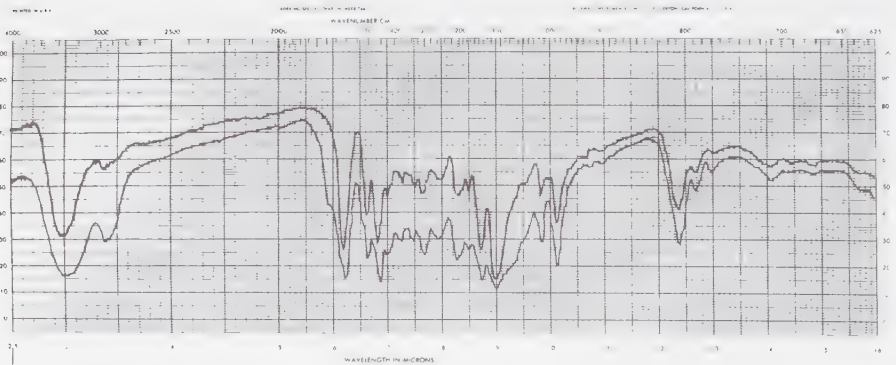


Abb. 83

IR-Überlagerungsspektrum von Methylphloroglucin- β -methyläther

Der Identitätsbeweis sollte durch Vergleich mit synthetischem 2,4-Dihydroxy-6-methoxytoluol erbracht werden. Diese Verbindung könnte auch als Schlüsselsubstanz zur Darstellung von synthetischem Melanervin Bedeutung gewinnen. Die Verbindung wurde 1902 von HERZIG und WENZEL (230) über eine KOLBE-SCHMITT-Reaktion erstmals erhalten (231) (Abb. 84 (I)). Eine GATTERMANN-KOCH-Synthese stammt von MCGOOKIN und Mitarb. (232) (Abb. 84 (II)). Ausgewählt wurde eine GATTERMANN-ADAM-Synthese, bei der ausgehend von Phloroglucin-monomethyläther zunächst 2,4-Dihydroxy-6-methoxy-benzaldehyd dargestellt und dieser zum 2,4-Dihydroxy-6-methoxy-toluol reduziert wird ^{*)} (Abb. 84 (III)).

Das Endprodukt ergab das gleiche NMR- und IR-Spektrum (Abb. 83, S. 131), wie das Phenol X. Somit war der Substitutionstyp des Abbauproduktes und gleichzeitig auch die Struktur des Fragmentes m/e 154 im Melanervin-Massenspektrum geklärt.

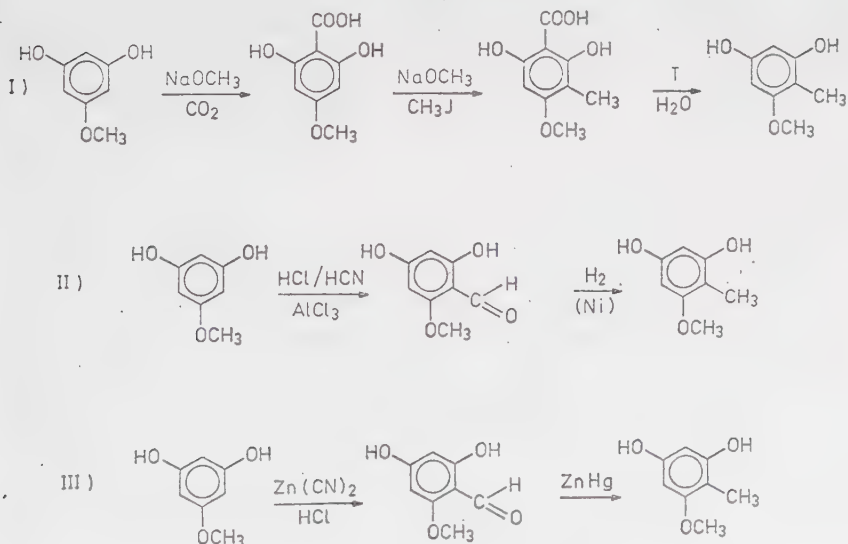


Abb. 84

Synthese von Methylphloroglucin- β -methyläther

^{*)} Die Synthese wurde von Dr. G. Janzso, Budapest, durchgeführt.

Zusätzlich zum Alkaliabbau wurde auch ein Abbau mit AlCl_3 (167) durchgeführt. Nach 2-stündiger Reaktion mit Melanervin in benzolischer Lösung entstand eine dunkelgrüne Lösung, die nach dem Verdünnen mit HCl eine rotgefärbte Benzoloberphase ergab. Diese wurde über eine Kieselgelsäule fraktioniert. Nach Elution mit Dichloräthan-Äthylacetat-Eisessig wurden 12 Fraktionen a 50 ml erhalten. Die Fraktionen 1,2,3 lieferten einen roten kristallinen Farbstoff. Die Fraktionen 4,5,6 enthielten einen gelb fluoreszierenden Stoff, der mit dem fluoreszierenden Fleck des Alkaliabbaus dünn-schichtchromatographisch gleiche Laufhöhe hatte (Abb. 85).

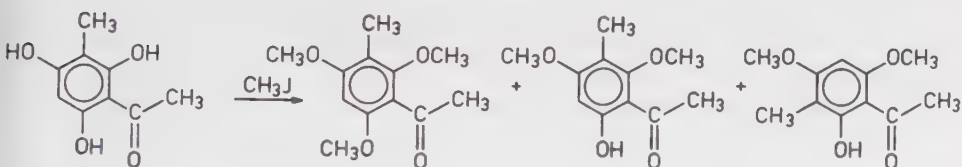


Abb. 85

DC der AlCl_3 -Abbauprodukte

- 1 = Methylphloroglucin 0.25 violettbraun
- 2 = Methylphloracetophenon 0.42 orange, Fluoresz. UV 360
- 3 = 3-u.5-Methyl-2-hydroxy-4,6-dimethoxyacetophenon 0.63 rot
- 4 = Methylphloracetophenon-trimethyläther 0.75 rotbraun
- 5 = roter Farbstoff 0.93 Eigenfarbe

Ein Teil der vereinigten Fraktionen 4-6 wurde methyliert (229), das Methylierungsgemisch auf Kieselgelschichten aufgetragen, mit Benzol-Aceton entwickelt und die 2 Hauptzonen ausgekratzt. Die quantitativ überwiegende davon ($R_f = 0.60$) ergab nach Eluieren einen öligen Rückstand. Das NMR-Spektrum dieses Öls zeigte 3 Methoxygruppen, eine Ar-CH_3 und eine Ar-CO-CH_3 -Gruppe, sowie ein aromatisches Proton (Abb. 86, S. 135). Nach dem NMR- und Massenspektrum handelte es sich um den Methylphloracetophenon-trimethyläther. Als weiteres Methylierungsprodukt wurde nach DC-Trennung ($R_f = 0.68$) ein kristalliner Rückstand vom Smp. 156° erhalten. Laut NMR- und Massenspektrum lag ein Gemisch aus 3- und 5-Methyl-2-hydroxy-4,6-dimethoxyacetophenon vor. Da chelierende 2-Hydroxy-Gruppen schwerer methylierbar sind, waren somit auch partiell methylierte Produkte entstanden.



Die beim AlCl_3 -Abbau primär erhaltene Verbindung muß demnach C-Methyl-Phloracetophenon gewesen sein. Im IR- und Massenspektrum war sie mit einem authentischen Syntheseprodukt in jeder Hinsicht identisch (Abb. 87, S. 135).

Die Identifizierung von C-Methyl-Phloracetophenon als Abbau- produkt war ein weiterer Beweis, daß im Flavanonanteil (A-Ring) von Melanervin eine Methylphloroglucin-Substitution vorgelegen haben muß und damit der Methylphloroglucinmonomethyläther-Sub- stituent im Rest R zu lokalisieren ist (s.S. 123).

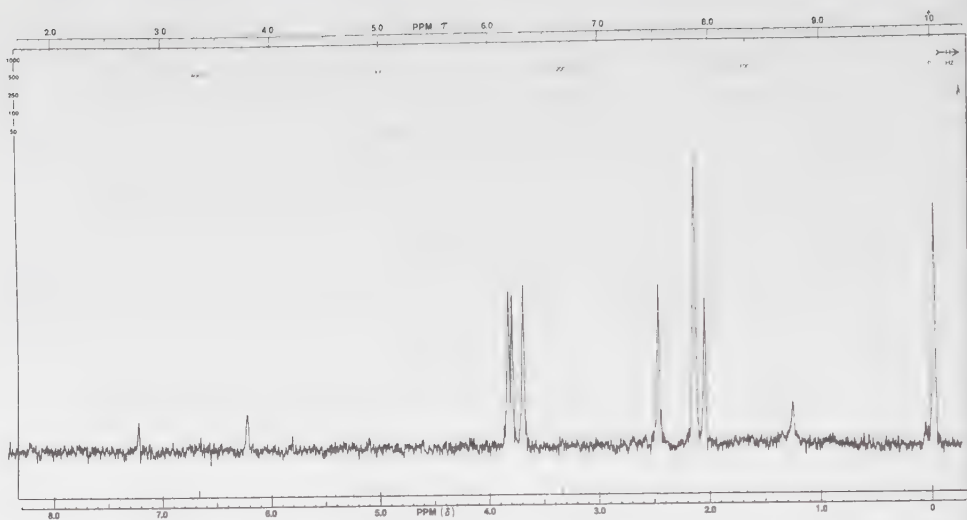


Abb. 86

NMR-Spektrum von Methylphloracetophenon-trimethyläther

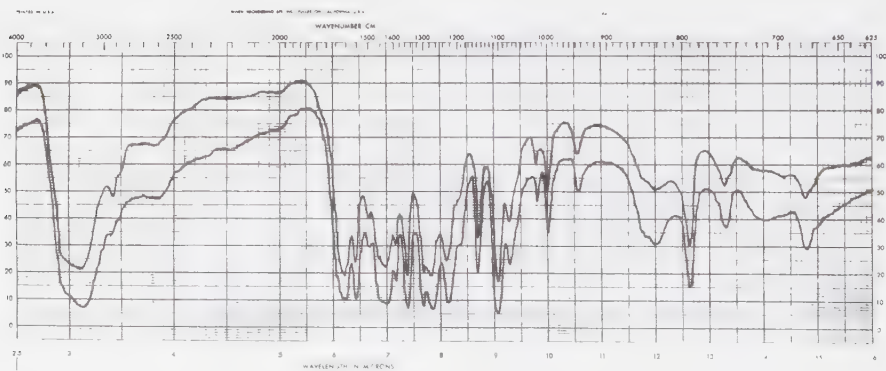


Abb. 87

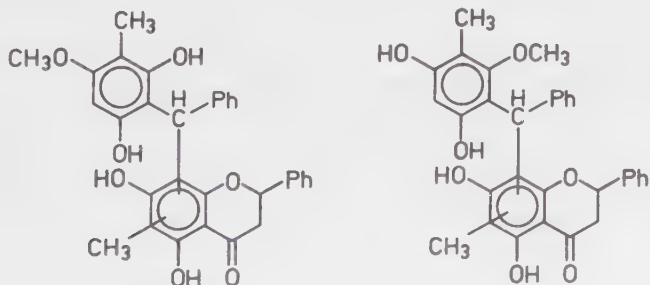
IR-Überlagerungsspektrum von Methylphloracetophenon

Die fluoreszierende Verbindung vom R_f -Wert 0.40, die beim Alkaliabbau angefallen war, war damit gleichzeitig als C-Methylphloracetophenon identifiziert. Damit lag die Vermutung nahe, daß die zweite gelb fluoreszierende Verbindung vom R_f -Wert 0.75 das entsprechende Melanervin-Acetophenon des Flavanonteils sein könnte. Da nicht genug Substanz davon isoliert werden konnte, war eine Sicherung dieses Befundes nicht möglich.

Die Substanz in den Fraktionen 7, 8, 9 war in allen analytischen Daten, mit dem bereits im alkalischen Abbau gefundenen Methylphloroglucin identisch.

Bei dem roten Farbstoff könnte es sich nach den UV-, IR- und NMR-Spektren um einen aromatischen KW handeln (M^+ 478). Seine Strukturaufklärung wurde nicht weiter verfolgt.

Unter Zugrundelegen aller bisher erhaltenen Ergebnisse konnte für das Flavonoidgrundgerüst eine 6- oder 8-Methylpinocembrin-Struktur ermittelt werden. Außerdem war abzuleiten, daß der Rest R aus einem Benzyl- und einem phenolischen Anteil zu einem Diphenylmethan kombiniert werden muß. Damit können zwei Alternativstrukturen für Melanervin aufgestellt werden.



Die Entscheidung, ob die Verknüpfung des "Benzylidenrestes" mit dem aufgefundenen Phenol in o- oder p-Stellung zur Methoxygruppe stattfindet, mußte vorerst noch offenbleiben, ebenso die Frage, ob der Diphenylmethylrest als 6- oder 8-Substituent gebunden ist. Durch die Darstellung von Melanervinderivaten sollte diese Frage geklärt werden.

4. Darstellung von Melanervinderivaten

Die Acetylierung mit Essigsäureanhydrid/Pyridin lieferte ein Produkt, das nach Umkristallisieren den Smp. 134° besaß und chromatographisch einheitlich erschien. Wie aus dem MS hervorging (M^{+} 680), konnte es sich hierbei nur um das Tetraacetat handeln. Die Fragmentierung verläuft teilweise in der für aromatische Acetoxyverbindungen typischen Weise durch Abspaltung von Keten- und Acetyleinheiten. Die Eliminierung von Essigsäure kann erklärt werden, wenn man dabei Ringschluß zu einem energetisch bevorzugten Aromaten annimmt (Xanthylium-Ion) (Abb. 88 u. Abb. 89, S. 138).

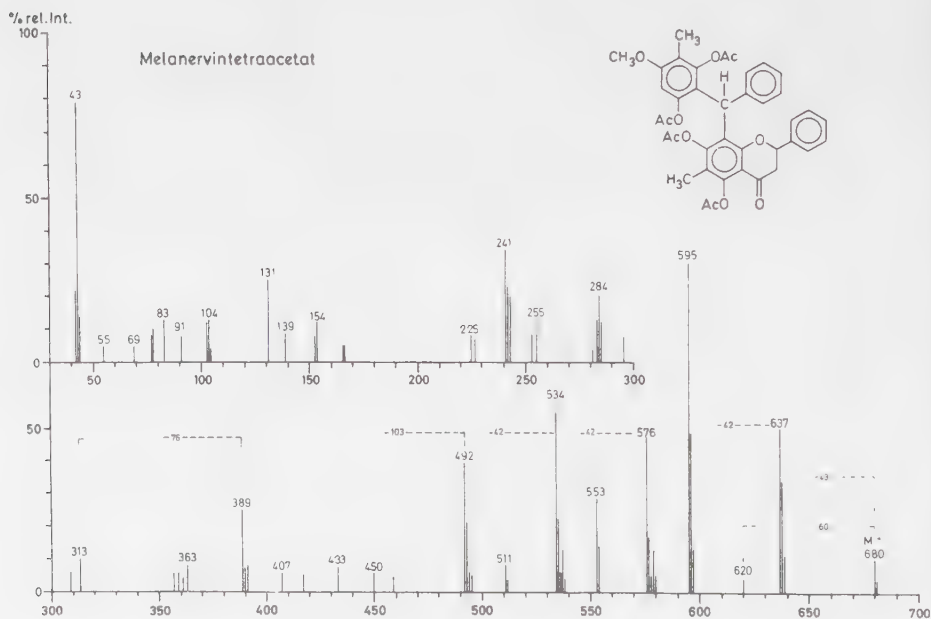


Abb. 88

MS von Melanervintetraacetat

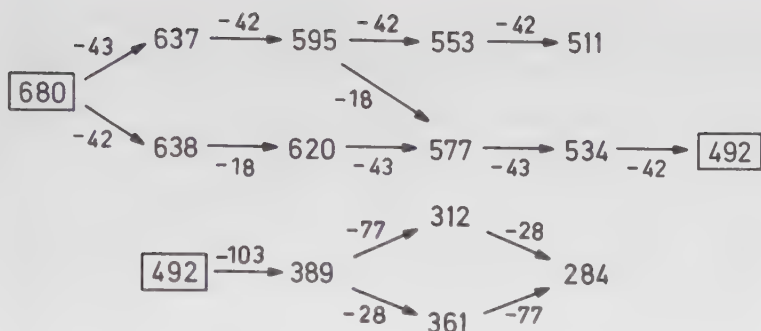


Abb. 89

Fragmentierungsschema von Melanervin-tetraacetat

Das NMR-Spektrum (Abb. 90, S. 139) zeigt überraschend nur eine OAc-Gruppe im typischen Bereich von $\delta = 2 - 2.5$ ppm. Sie muß bei Fehlen einer chelatisierten OH-5-Gruppe die C₅-Position einnehmen. Die weiteren 3 OAc-Gruppen erscheinen zusammen mit den Ar-CH₃-Gruppen im Bereich von 2 ppm und darunter (Integration 15 H). Diese diamagnetische Verschiebung ist durch einen Abschirmeffekt aromatischer Ringe zu erklären, der zu beobachten ist, wenn CH₃-Gruppen in den Einfluß des Ringstroms oberhalb der σ -Ebene von Aromaten geraten (233). Um die Lage der Methylprotonen an Modellverbindungen zu studieren, wurde das Strobopinin-7-monoacetat und das Strobopinin-5,7-diacetat hergestellt. Die Acetoxygruppen zeigten hier Signale bei $\delta = 2.43$ ppm für die OAc-5-Gruppe und bei $\delta = 2.34$ ppm für die OAc-7-Gruppe. Die CH₃-6-Gruppe absorbiert bei $\delta = 2.00$ ppm. Eine orthoständige CH₃-Gruppe in 6-Position konnte demnach nicht Anlaß zu einem derartigen Shielding-Effekt sein. Etwa gleiche chemische Verschiebungen der CH₃-Signale ergab Kryptostrobin-diacetat. Dagegen ist von Biflavonoiden bekannt, daß ihre Acetate solche Shifts ergeben können (234). Die für das Flavanon charakteristischen CH-2- und CH₂-3-Signale sind bei gleicher chemischer Verschiebung zu finden. Die 2 Protonen im Aromatenbereich bei $\delta = 5.91$ und $\delta = 6.32$ ppm können dagegen, wenn man

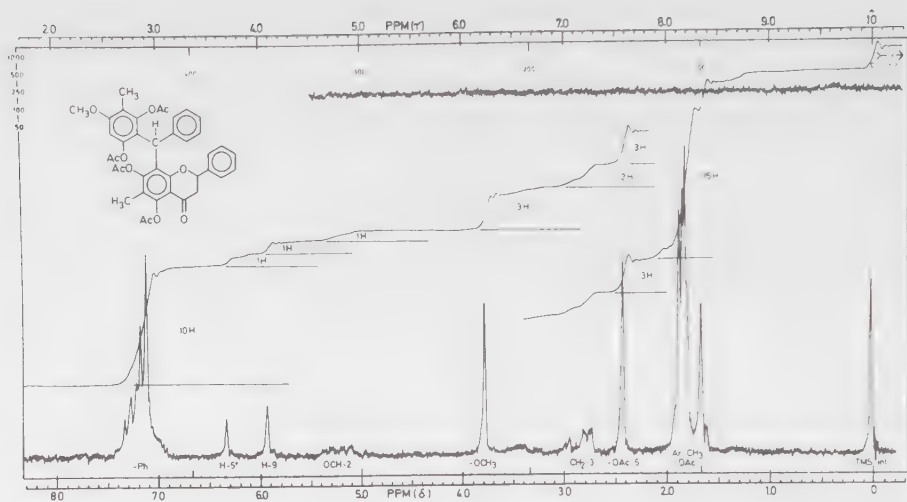


Abb. 90

NMR-Spektrum von Melanervintetraacetat

einen Vergleich mit den Modellacetaten anstellt, kaum von A-Ring-Protonen stammen. Daraus folgt, daß der A-Ring vollsubstituiert sein muß. Die OCH_3 -Gruppe ist bei gleichem δ -Wert wie bei Melanervin zu finden.

Da das IR-Spektrum keine ausgeprägte OH-Bande und das UV-Spektrum keinen AlCl_3 -Shift zeigte, hatte eindeutig ein Peracetat vorgelegen. Ebenso läßt die CO-Bande bei $\bar{\nu} = 1675 \text{ cm}^{-1}$ erkennen, daß auch die C_5 -OH-Gruppe acetyliert ist (Abb. 91, S. 140).

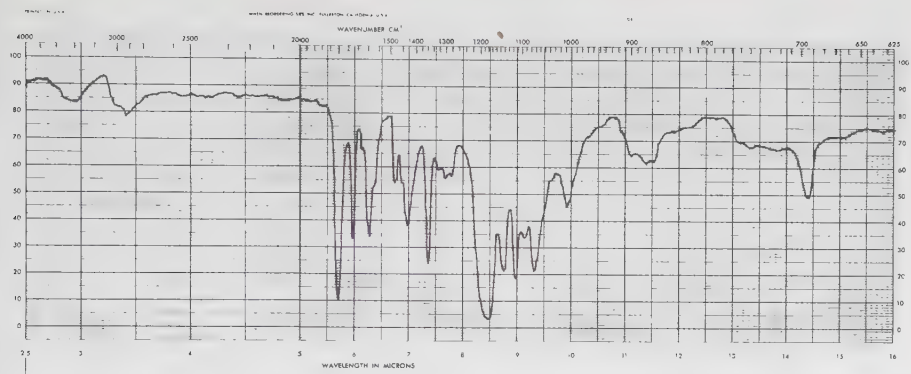


Abb. 91

IR-Spektrum von Melanervin-tetraacetat

Da Dehydrierungen von Flavanonen zu Flavonen häufig mit Acetaten unternommen werden, versuchten wir das Melanervin-tetraacetat mit SeO_2 zu dehydrieren. Wir erhielten nur eine geringe Menge einer Verbindung vom M^+ 678. Weitere Untersuchungen mußten wegen Substanzmangel unterbleiben.

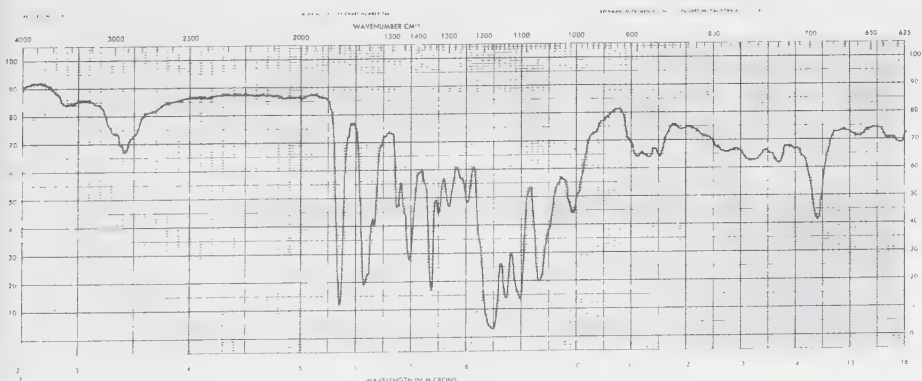


Abb. 92

IR-Spektrum von Melanervin-triacetat

Bei einem zweiten Acetylierungsansatz mit Acetanhydrid-Natriumacetat erhielten wir ein Gemisch von 2 Acetaten. Neben dem eben beschriebenen Vollacetat, welches bei $R_F = 0.66$ blau fluoresziert, entstand noch ein weiteres Produkt mit dem R_F -Wert bei 0.79 und rötlicher Fluoreszenz. Nach Isolierung aus Kieselgelplatten wurde das zweite Produkt als das Melanervin-triacetat erkannt, welches in 5-Position noch hydroxyliert ist. Trotz chromatographischer Reinheit in mehreren Fließmittelsystemen zeigte das NMR-Spektrum, daß es aus einem Isomeren-Gemisch (ev. zweier Diastereomeren) bestand. Die Lage der CH_3 -Signale war hier gleichermaßen stark wie beim Tetraacetat verschoben. Das OAc-5 fehlte, dafür aber zeigte die OH-5-Spitze bei $\delta = 12.21$ ppm und das IR-Spektrum (Abb. 92, S. 140) eine chelatisierte OH-Gruppe an. In Einklang damit stand auch die fehlende CO-Bande bei $\bar{\nu} = 1675 \text{ cm}^{-1}$. Schließlich wurde massenspektrometrisch das Molekulargewicht von 638 ermittelt.

Methylierung mit DMS und K_2CO_3 ergab ein orangegelbes Öl, aus welchem nach Aufnahme in EtOH ein weiß-gelber, amorpher Niederschlag ausfiel. Da ein Gemisch vorlag, wurde es über DC-Platten getrennt. Die beiden Hauptkomponenten dieses Gemisches wurden isoliert. Das IR-Spektrum (Abb. 93) der lipophileren Zone zeigte keine OH-Bande mehr, dafür aber eine CO-Bande bei 1640 cm^{-1} . Permethylierte Flavanone zeigen die CO-Bande dagegen bei höheren Schwingungszahlen um 1675 cm^{-1} (235).

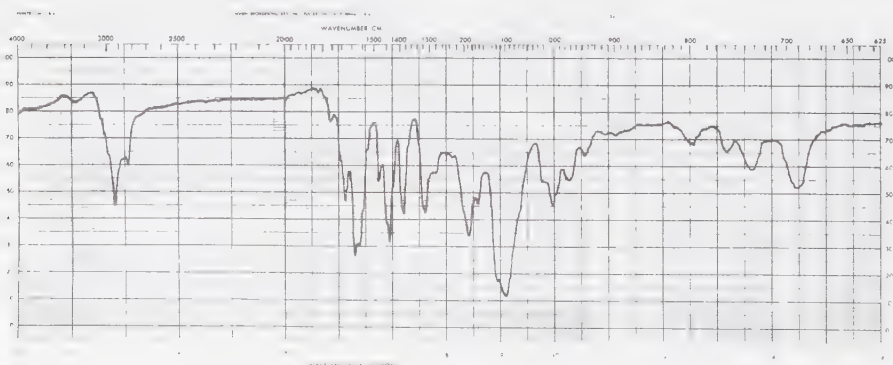


Abb. 93

IR-Spektrum von Melanervin-chalkon-pentamethyläther

Dies war ein erster Hinweis auf eine Chalkonstruktur, die durch Ringöffnung im alkalischen Medium und anschließender Methylierung der dabei freiwerdenden OH-Gruppe, entstanden war. Die Beweisführung gelang durch das Massenspektrum (Abb. 94).

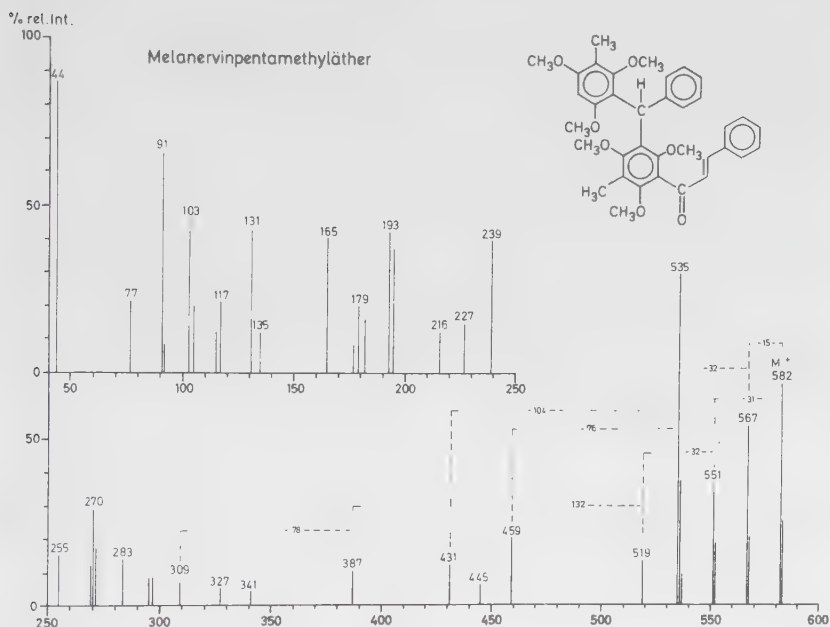


Abb. 94

MS von Melanervin-chalkon-pentamethyläther

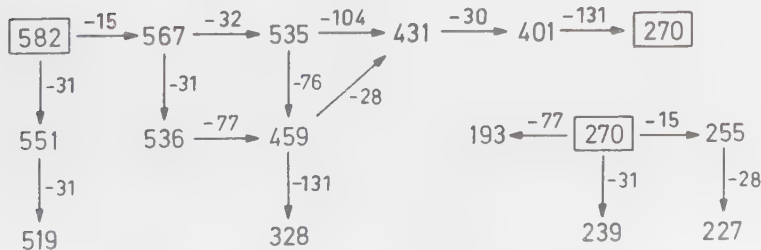


Abb. 95

Fragmentierungsschema von Melanervin-chalkon-pentamethyläther

Der Molekülpeak bei 582 mu entsprach einem Melanervin-chalkon-pentamethyläther. Das Fragmentierungsschema (Abb. 95, S. 142) ist zu deuten, wenn man annimmt, daß durch primäre Abspaltung von CH_3OH und CH_3 ein neuer Ringschluß entstanden ist. Der Base-peak bei m/e 535 kann infolge Stabilisierung durch einen anelierten Aromaten erklärt werden.

Das NMR-Spektrum (Abb. 96) endlich ließ erkennen, daß kein Flavanon mehr vorgelegen hatte. Die beiden Dubletts ($J = 16 \text{ Hz}$) können den $\text{CH-}\alpha$ - und $\text{CH-}\beta$ -Protonen des trans-Cinnamoyl-Restes zugeordnet werden. Ein Lanthaniden-induzierter Shift mit $\text{Eu}(\text{fod})_3$ zeigte dies deutlicher. Die Integration ergab wieder 10 Phenylprotonen. Sie liegen in zwei überlappten Multipletts bei $\delta = 7.0 - 7.6 \text{ ppm}$ vor. Hinweise auf die Struktur ergaben die 4 stark abgeschirmten OCH_3 -Gruppen bei $\delta = 3.50, 3.22, 3.16$ und 3.12 ppm . Zwei Methoxygruppen bei $\delta = 3.71$ und 3.81 ppm sind dagegen weniger abgeschirmt, wobei eine ursprünglich aus dem Melanervin stammen muß.

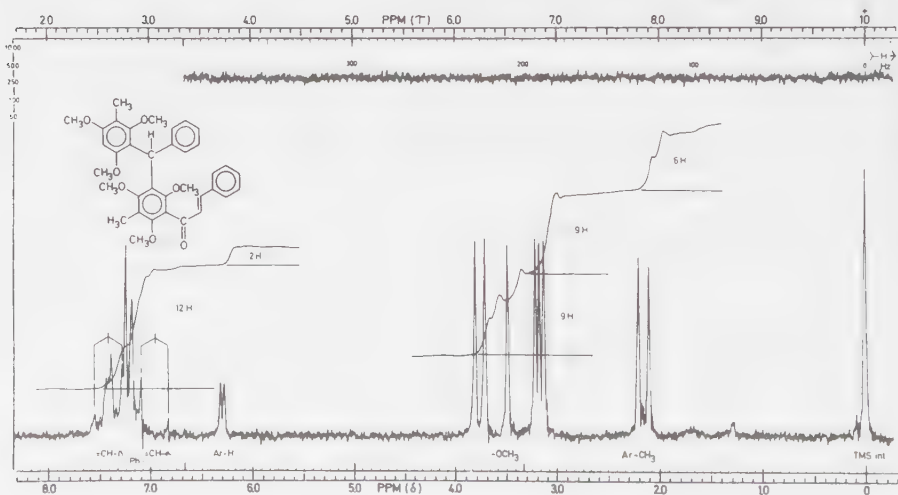


Abb. 96

NMR-Spektrum von Melanervin-chalkon-pentamethyläther

Das zweite Methylprodukt (untere Zone) ergab 5 Methoxy-Gruppen, war also ein Tetramethyläther, gab aber keine Flavanonsignale. Ein aromatisches Proton war stark verschoben, das Molekulargewicht lag bei 554 mu. Es könnte sich hierbei um ein Stilben-derivat handeln.

Zur Strukturaufklärung von Biflavonoiden wurden Solvens-induzierte Shifts und Lanthaniden-Shifts von Methoxy-Gruppen herangezogen (236,237). Von PELTER (238) wird jedoch beschrieben, daß für stark abgeschirmte OCH_3 -Gruppen die aufgestellten Regeln nicht gelten, sodaß Mißdeutungen möglich sind.

Die Zuordnung der OCH_3 -Signale mußte deshalb an Modellverbindungen studiert werden. Zu diesem Zweck wurden 2,4,6-Trimethoxybenzol und 2,4,5-Trimethoxybenzol mit Benzaldehyd zu den entsprechenden Triphenylmethanverbindungen kondensiert (239). Das NMR-Spektrum von Bis-(2,4,6-trimethoxyphenyl)-phenylmethan zeigt für die OCH_3 -Gruppen in o,o'-Stellung zur Benzal-Gruppe eine diamagnetische Verschiebung von 0.3 ppm gegenüber den paraständigen OCH_3 -Gruppen bei $\delta = 3.78$ ppm. Im Vergleich dazu liegt das Methoxysignal von Melanervin bei 3.71 ppm. Ebenso wie in der Modellverbindung können auch beim Pentamethyläther die stark hochfeldverschobenen Signale den ortho-Positionen zur Benzal-Gruppe zugeordnet werden, wenn man davon ausgeht, daß eine Triphenylmethanstruktur zugrunde liegt. Als vorläufiges Ergebnis ist festzuhalten, daß 4 OH-Gruppen des Melanervin-Chalkons orthoständig zur Benzal-Gruppe angeordnet sind. Aufgrund der erhaltenen Vergleichsdaten müßte die in Melanervin ursprünglich vorliegende OCH_3 -Gruppe also paraständig zur Benzal-Gruppe liegen.

Der Alkaliabbau von Melanervin-chalkon-pentamethyläther in alkoholischer KOH (240) sollte wieder Abbauprodukte liefern, die Rückschlüsse auf die Struktur erlaubten. Neben nicht umgesetztem Ausgangsmaterial erhielten wir im Gaschromatogramm (Abb.97, S. 145) des Abbaugemisches 6 Haupt-Peaks, die durch GC-MS untersucht wurden, da eine Isolierung nicht in Frage kam.

Peak 1 ($t_R = 6.1$ min) war 2,4,6-Trimethoxytoluol.

Peak 2 und Peak 3 ($t_R = 8.5$ u. 14.0 min) waren mit Benzoesäure und Zimtsäure identisch. Die 3 Verbindungen wurden wieder mit Hilfe von authentischen Testsubstanzen durch Cochromatographie sowie GC-MS identifiziert.

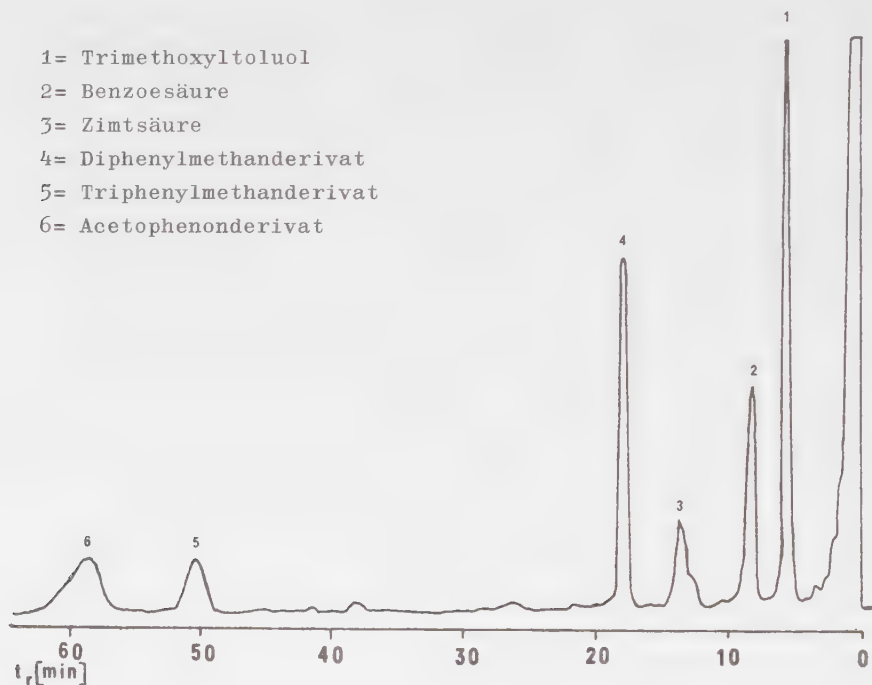


Abb. 97

GC der PM- Melanervin-Abbauprodukte

(2 m, 6x3 mm, 10% UCCW-982, $150 - 250^{\circ}$, $5^{\circ}/\text{min}$, 65 ml He/min)

Der breite Peak 6 mit der Retentionszeit $t_R = 58$ min, der in relativ hoher Ausbeute beim Abbau erhalten wurde, lieferte bei der GC-MS-Analyse ein MG von 494, welches mit dem "Acetophenon" des Melanervin-chalkon-pentamethyläthers übereinstimmte. Die Struktur eines 2,4,6-Trimethoxy-5-methyl-3-(2,4,6-trimethoxytolyl)-benzyl-acetophenon(I) Abb.98, konnte durch die starken M-15, M-31, M-47-Peaks, sowie deren weitere Fragmentierung gestützt werden (Abb. 98, S. 146).

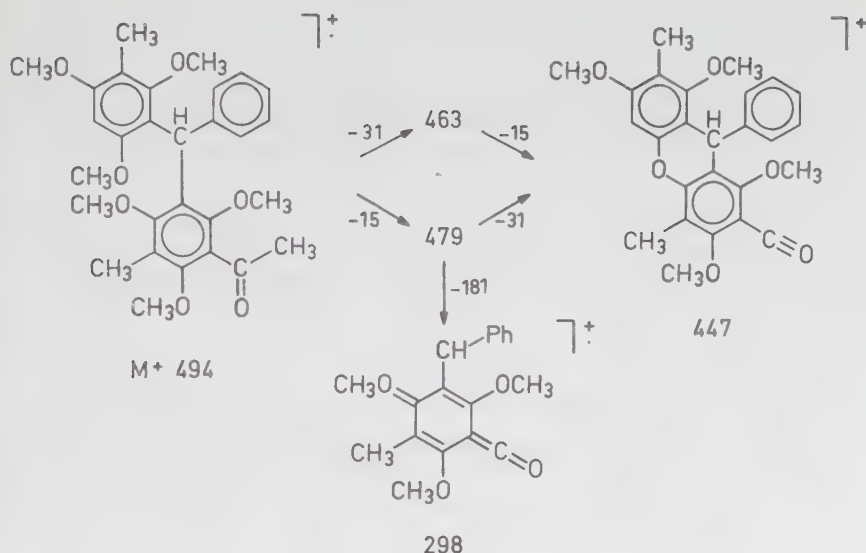


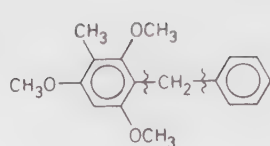
Abb. 98

Fragmentierungsschema von (I)

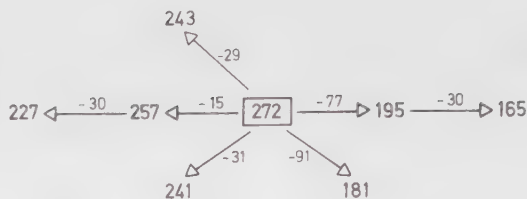
Aus dem Gemisch konnten ferner eine Diphenyl- und eine Triphenylmethanverbindung gaschromatographisch abgetrennt und durch MS identifiziert werden. Sie liefern den endgültigen Nachweis für eine Triphenylmethanstruktur von Melanervin.

Die Substanz Peak 4 ($t_r = 18.4$ min) hatte nämlich einen Molekülpeak bei m/e 272 und zeigte einen Zerfall, der plausibel für ein 2,4,6-Trimethoxy-3-methyl-diphenylmethan gedeutet werden konnte. Die Fragmentierung verläuft nach MEYERSON (241) über einen cyclischen Prozeß, der für o-Hydroxy- und o-Methoxy-diphenylmethan-Verbindungen typisch ist (Abb. 99, S. 147). Bei Xanthorrhon, einem Flavanon-Flavan-Dimeren, tritt eine ähnliche Fragmentierung auf (242).

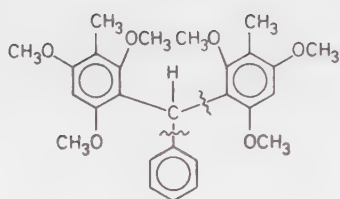
Peak 5 mit der Retentionszeit $t_r = 51$ min lieferte im GC-MS einen Molekülpeak von m/e 452 und einen gegenüber der Triphenylmethan-Modellsubstanz homologen Zerfall, d.h. die Fragmente differierten um 14 und 28 mu. Damit sollte es sich bei Peak 5 um Bis-(2,4,6-tri-methoxy-3-methylphenyl)-phenylmethan handeln (Abb. 99, S. 147).



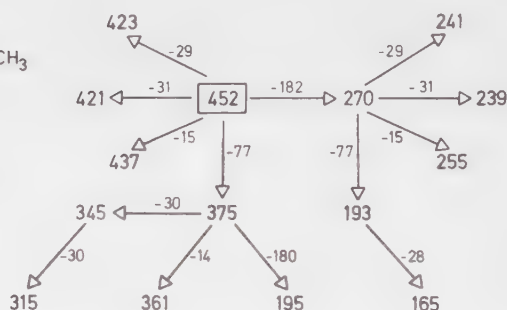
$C_{17}H_{20}O_3$



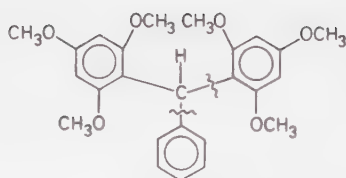
2,4,6 - Trimethoxy - 3 - methylphenyl - phenylmethan



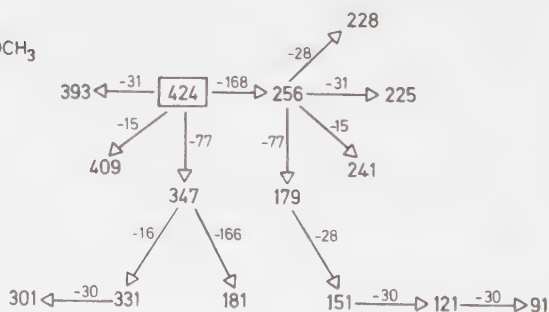
$C_{27}H_{32}O_6$



Bis - [2,4,6 - trimethoxy - 3 - methylphenyl] - phenylmethan



$C_{25}H_{28}O_6$



Bis - [2,4,6 - trimethoxyphenyl] - phenylmethan

Abb. 99

Fragmentierung von PM-Abbauprodukten

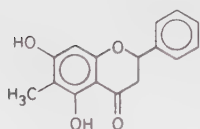
Ein Versuch, diese Verbindung aus 2,4,6-Trimethoxytoluol und Benzaldehyd unter Säurekatalyse zu kondensieren, ergab keine Reaktion. Erst mit Hilfe von Zink-II-chlorid n.Erhitzen erhielten wir ein Reaktionsprodukt. Es erwies sich aber als ein Gemisch von mindestens 6 Komponenten. Durch GC-MS-Analytik konnte hieraus eine Verbindung erhalten werden, die sich mit dem obigen Abbauprodukt hinsichtlich Molekülmasse (M^+ 452) und Retentionszeit identisch erwies. Als weitere Verbindungen wurden aus dem Synthesegemisch eine Diphenylmethanverbindung erhalten, die mit dem Abbauprodukt (2,4,6-Trimethoxy-3-methylphenyl)-phenylmethan gleiche Retentionszeit und gleiches MS hatte, sowie Bis-(2,4,6-trimethoxy-3-methyl-phenyl)-methan und 2,4,6-Trimethoxy-toluol.

Die Trimethylsilylierung von Melanervin, die mit HMDS+TMCS in Pyridin durchgeführt wurde, ergab ein Per-TMS-Produkt von Melanervin. Der Molekülpeak von m/e 800 stimmte mit den geforderten 4 OH-Gruppen überein, d.h. mit einem Melanervin-tetra-(trimethylsilyl)-äther. Die intensiven M-15 und M-73-Peaks bei m/e 785 und m/e 727 entstehen durch Abspaltung von CH_3 bzw. $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$. Das Fehlen eines Peaks bei m/e 712 ($\text{M-Si}(\text{CH}_3)_4$) indiziert ferner, daß keine orthoständigen TMS-Äther-Gruppen vorliegen. Im NMR-Spektrum waren auffallend stark abgeschirmte CH_3 -Si-Gruppen zu beobachten.

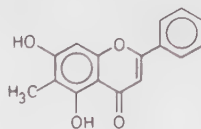
Wie bereits erwähnt, ergab Melanervin nach Deuterium-Austausch mit $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{D}$ in $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ -Lösung ein Pentadeutero-Produkt. Durch Verdünnen dieser Lösung mit Deuteriochloroform kristallisierte eine Verbindung vom Smp. 183° aus. Das Massenspektrum davon wurde angefertigt. Bekanntlich werden Deuteroxy-Gruppen beim Verdampfen im Direkteinlaß nicht voll erfaßt. Eine Sättigung der Ionenquelle mit D_2O ist erforderlich, um einen Austausch mit dem H_2O -Restgas zu verhindern. Selbst dann waren Molekül- und Fragment-Ionen mit entsprechenden Substituenten nicht quantitativ deuteriert. Eine Erhöhung ihrer Massen um 1-2 mu war zu erkennen, jedoch nicht mehr. Die Fragmente, welche das acide Triphenylmethan-Deuteron enthalten sollten, waren dagegen eindeutig um eine Masseneinheit verschoben.

m/e 242 $\longrightarrow$ 243 358 $\longrightarrow$ 359 254 $\longrightarrow$ 255

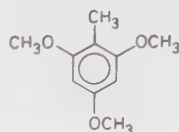
Die insgesamt erhaltenen Abbauprodukte (Abb. 100) erhärten den auf Seite 136 angegebenen Strukturvorschlag für Melanervin.



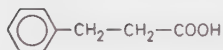
Strobopinin



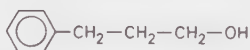
Strobchrysin



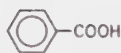
2,4,6-Trimethoxytoluol



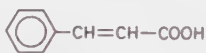
Hydrozimsäure



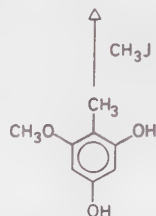
3-Phenylpropanol-1



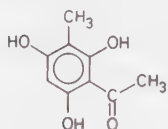
Benzoessäure



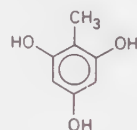
trans-Zimsäure



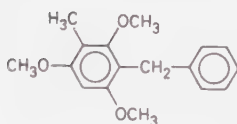
2-Methoxy-4,6-dihydroxytoluol



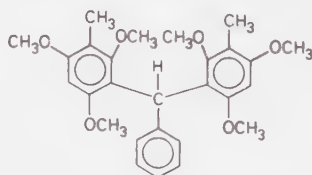
C-Methyl-phloracetophenon



C-Methyl-phloroglucin



[2,4,6-Trimethoxy-3-methylphenyl]-phenylmethan



Bis-[2,4,6-Trimethoxy-3-methylphenyl]-phenylmethan

Abb. 100

Abbauprodukte aus Melanervin

5. Isomelanervin und Derivate

Zur Isolierung wurde der Chloroformextrakt von *Melaleuca quinquenervia*-Blüten nach wiederholter Behandlung mit Ligroin in Äther gelöst und mit 2%iger NaOH ausgeschüttelt. Es bildete sich in der wässrigen Phase ein brauner Niederschlag, der abgenutscht und als Rohbetulinsäure abgetrennt wurde. Das mit HCl angesäuerte Filtrat ergab nach einigen Tagen einen flockigen Niederschlag von Isomelanervin. Durch Säulenchromatographie an Kieselgel im System Benzin-Äther-Aceton wurde Isomelanervin rein erhalten. Nach Umkristallisieren aus Äthanol-Chloroform wurden Niederschläge vom Smp. 235-237° gewonnen^{*)}.

Das UV-Spektrum hatte Maxima bei 299 und 338 nm und glich somit innerhalb der Fehlergrenze dem des Melanervins. Bei Konzentrationsänderungen ergaben sich die gleichen reversiblen Intensitätsverschiebungen der beiden Maxima wie schon bei Melanervin beobachtet. Auch die Zugabe von Shift-Reagenzien bewirkte die gleiche Bathochromie für das Maximum bei 299 nm. Eine Abweichung ergab sich nur beim NaOMe-Shift, der bei Isomelanervin nur + 30 nm betrug.

Das Massenspektrum war mit Ausnahme von Intensitätsabweichungen mit dem von Melanervin identisch und bedurfte somit keiner weiteren Diskussion.

Das IR-Spektrum (Abb. 101, S. 151) zeigte im Absorptionsverlauf Ähnlichkeit mit dem von Melanervin. Änderungen traten besonders im Fingerprint-Bereich sowie bei den Aromaten-out of plane-Schwingungen auf. Die C=O-Schwingung des Chromanonteils zeigte eine geringe hypsochrome Verschiebung von 10 cm⁻¹ gegenüber dem Melanervin-Spektrum. Eine sterische Hinderung oder eine abgeschwächte Chelatisierung der C=O-Gruppe könnte hier die Ursache sein. Im Bereich der OH-Banden fielen ausgeprägte H-Brücken-Bindungen auf.

*) Die Isolierung von Isomelanervin wurde von Dr. H. P. Hörhammer in unserem Arbeitskreis ausgeführt.

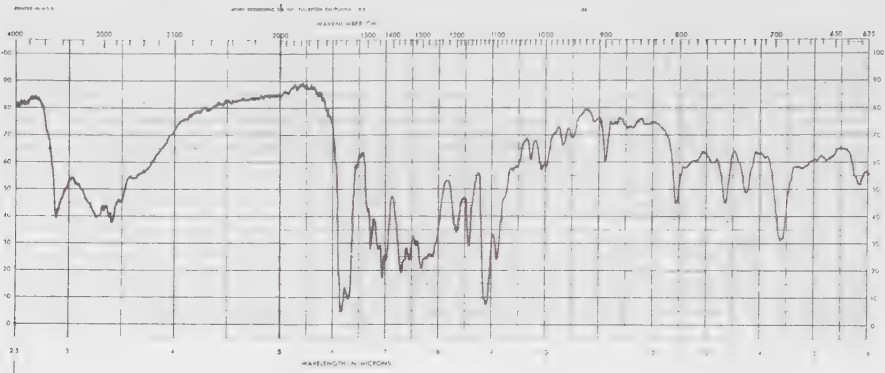


Abb. 101
IR-Spektrum von Isomelanervin

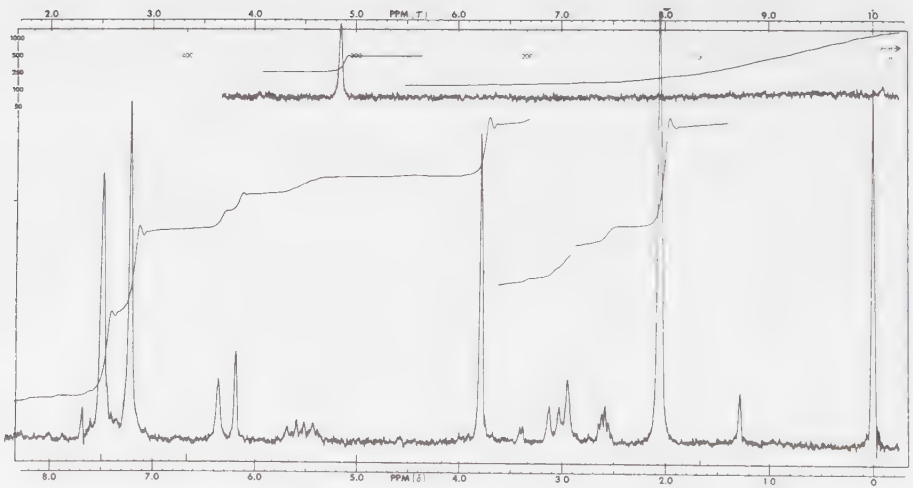


Abb. 102
NMR-Spektrum von Isomelanervin

Über die strukturellen Unterschiede gab das NMR-Spektrum (Abb. 102, S. 151) Aufschluß. Melanervin und Isomelanervin ließen innerhalb einer Differenz von ± 2 Hz gleiche chemische Verschiebungen erkennen: und zwar für die CH-2 und CH₂-3-Signalgruppen, das austauschbare Triphenylmethanproton, die OCH₃- und CH₃-Gruppen, sowie die Phenylgruppen. Für die restlichen Protonen ergab die kernmagnetische Resonanz bei gleicher Temperatur, Konzentration und Solvens geringe Abweichungen. Das aromatische Proton bei $\delta = 6.35$ ppm zeigte eine Abschirmung von 0.20 ppm, während das OH-Proton bei $\delta = 13.75$ ppm um ca. 1.0 ppm entschirmt wurde. Anisotropieeffekte infolge der sterisch sehr behinderten Struktur können die Ursache sein. Die Spektren lassen insgesamt erkennen, daß bei der isomeren Verbindung keine größeren strukturellen Unterschiede vorliegen können.

Die Acetylierung von Isomelanervin mit Ac₂O/Pyridin bei Raumtemperatur ergab ein Triacetat vom Smp. 133-134°. Die freie OH-Gruppe war, wie aus dem Signal bei $\delta = 12.3$ ppm des NMR-Spektrums (Abb. 103, S. 153) hervorgeht, in 5-Position zu lokalisieren. Wie zu erwarten, waren die Acetylgruppen ebenfalls stark abgeschirmt und in den Bereich von $\delta = 1.91$ bis 1.70 ppm diamagnetisch verschoben. Das Singulett bei 6.52 ppm zeigt einen Acetatshift von 0.17 ppm (gegenüber Isomelanervin in DMSO) und 0.66 ppm (gegenüber dem Isomelanervin-tris-TMS-äther in CCl₄) und dürfte somit ein zu einer OH-Gruppe ortho-ständiges Proton anzeigen.

Im IR-Spektrum (Abb. 104, S. 153) lag die C=O-Bande des Flavons bei $\bar{\nu} = 1625$ cm⁻¹. Dieser Wert ist typisch für ein o-Hydroxy-Arylketon (243). Weiter ist eine durch intramolekulare Chelatisierung "verschmierte" OH-Bande bei 2500 - 3100 cm⁻¹ zu erkennen. Eine AlCl₃-Komplexierung im UV-Spektrum ließ sich aber nicht erreichen.

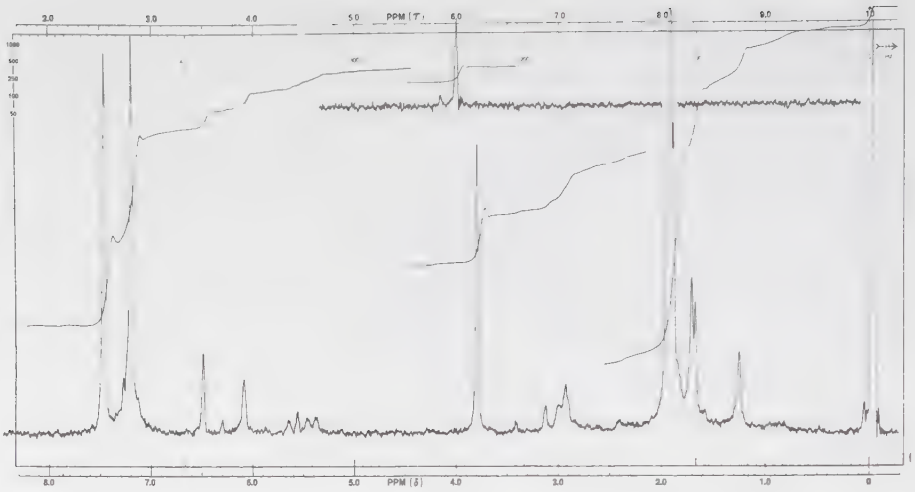


Abb. 103
NMR-Spektrum von Isomelanervintriacetat

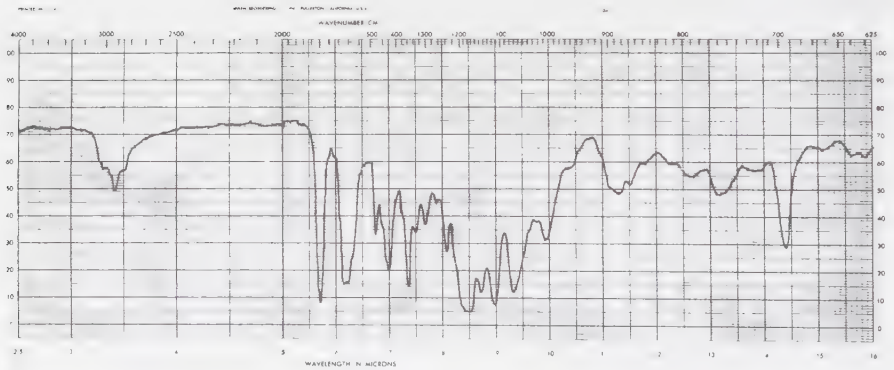


Abb. 104
IR-Spektrum von Isomelanervintriacetat

Die Acetylierung mit Acetanhydrid und Natriumacetat lieferte nach längerem Rückflußkochen zusammen mit dem Triacetat ($R_f = 0.77$) ein Tetraacetat von Isomelanervin vom Smp. 147° ($R_f = 0.70$) welches durch präparative DC abgetrennt wurde. Aus dem IR-Spektrum (Abb. 106, S. 155) war zu erkennen, daß die Ketobande nunmehr bei 1680 cm^{-1} absorbierte, die breite OH-Bande bei ca. 2900 cm^{-1} war verschwunden. Die am C-5-O gebundene Acetylgruppe war im NMR-Spektrum nun ebenfalls nach δ -Werten < 2 verschoben, wie das Integral für insgesamt 6 Methylgruppen anzeigte.

Daraus konnte man schließen, daß im Melanervintetraacetat nur 3 OAc-Methyl-Gruppen abgeschirmt, d.h. o-ständig zur Benzal-Gruppe angeordnet sind, während dies im Isomelanervintetraacetat für alle vier OAc-Gruppen zutraf. Die Peracetylierung ist gegenüber dem Melanervin offensichtlich infolge sterischer Behinderung schwerer zu erzielen. Auch die Per-trimethyl-silylierung von Isomelanervin konnte nicht erreicht werden. Das NMR-Spektrum des Silylierungsproduktes war mit einem Isomelanervin-2",6",7-tris(trimethylsilyl)-äther in Übereinstimmung.

Der Versuch, aus Isomelanervin ein einheitliches Methylierungsprodukt zu erhalten, scheiterte an der Vielzahl der Reaktionsprodukte.

Schließlich wurde auch die Möglichkeit der Ringisomerisierung geprüft. Erhitzen von Melanervin in alkoholischer NaOH ergab eine orange Lösung von Melanervin-Chalkon, welche nach Ansäuern und Ausäthern dünn-schichtchromatographisch neben Melanervin den Nachweis von Isomelanervin gestattete. Die Tendenz zur Isomerisierung über das Chalkon ist offensichtlich nicht sehr stark ausgeprägt, da überwiegend das Edukt erhalten wurde.

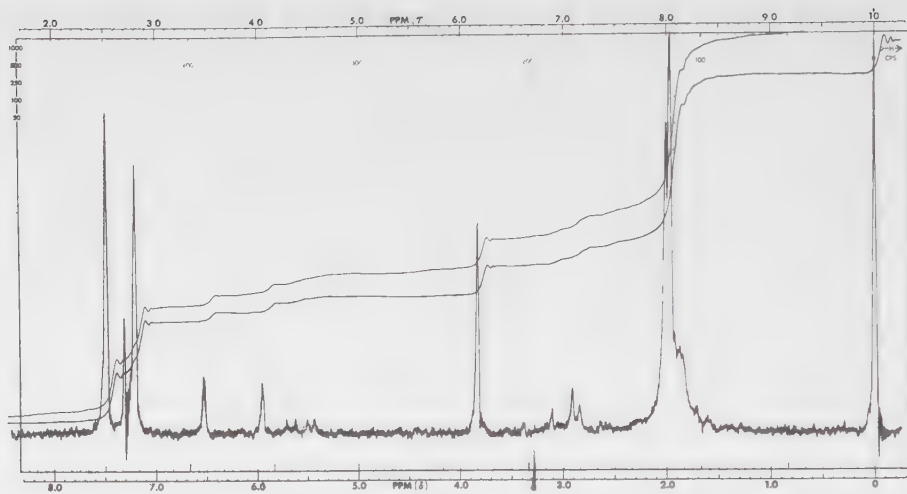


Abb. 105
NMR-Spektrum von Isomelanervintetraacetat

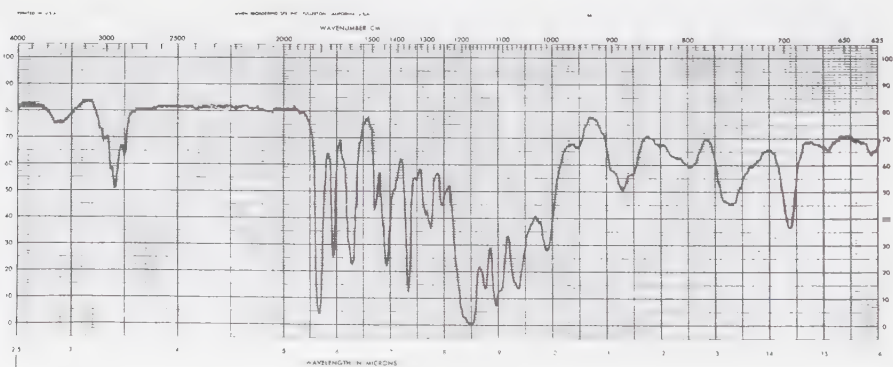


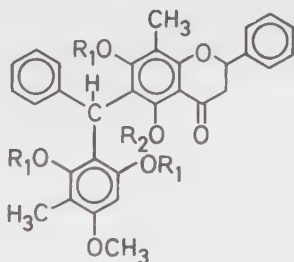
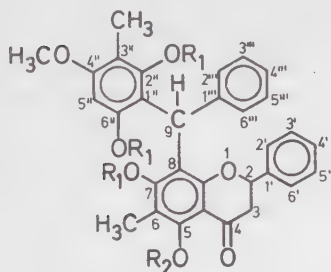
Abb. 106
IR-Spektrum von Isomelanervintetraacetat

6. Zur Konstitution und Stereochemie von Melanervin

Der signifikante Unterschied der beiden isomeren Tetraacetate im NMR-Spektrum kann plausibel erklärt werden, wenn man für Melanervin die 8-Substitution und für Isomelanervin die 6-Substitution des Diphenylmethylrestes postuliert. Somit wäre die Konstitution des Naturstoffes Melanervin:

2,4-Dihydroxy-6-methoxy-tolyl-3-(5,7-dihydroxy-6-methyl)-flavanonyl-8-phenylmethan oder 8-(2'',6''-Dihydroxy-4''-methoxy-3''-methyl)-diphenylmethyl-Strobopinin. Es handelt sich hierbei um die unseres Wissens erste Triphenylmethan-Verbindung, die im Pflanzenreich aufgefunden wurde. Das bis jetzt nur als Artefakt gefundene Isomelanervin hätte dann die Konstitution:

2,4-Dihydroxy-6-methoxy-tolyl-3-(5,7-dihydroxy-8-methyl)-flavanonyl-6-phenylmethan.



$R_1 = R_2 = H$ Melanervin
 $R_1 = R_2 = Ac$ Melanervin-tetraacetat

$R_1 = R_2 = H$ Isomelanervin
 $R_1 = R_2 = Ac$ Isomelanervin-tetraacetat

$R_1 = Ac; R_2 = H$ Melanervin-2'',6'',7-triacetat

$R_1 = Ac; R_2 = H$ Isomelanervin-2'',6'',7-triacetat

Zur Konfiguration ist festzustellen, daß sowohl Melanervin als auch Isomelanervin zwei Asymmetriezentren in C-2 und C-9 aufweisen, sodaß pro Molekül 2 Diastereomerenpaare möglich sind. Nimmt man an, daß in C-2 die S-Konfiguration, wie bei Flavononen allgemein üblich (244-246), vorliegt, so sind immer noch 2 epimere Formen von Melanervin und 2 epimere Isomelanervin-Strukturen theoretisch möglich. DREIDING-Modelle von Melanervin

lassen zudem erkennen, daß infolge starker Rotationsbehinderung das Molekül in verschiedenen konformeren Formen angeordnet werden kann. Es gibt auch experimentelle Hinweise aus dem NMR-Spektrum, daß bei Raumtemperatur 2 oder mehr stabile Konformere existieren.

Verschiedene Signalgruppen zeigen z.B. breite Peaks oder solche mit mehreren Spitzen, welche bei höheren Temperaturen reversibel schärfer ausgeprägt und vereinfacht werden. Das NMR auf Abb.72, S. 120) wurde bei 100° aufgenommen. Bei Raumtemperatur stabile Konformationsisomere sind von Biphenyl-Derivaten lange bekannt (Atropisomerie), wenn durch sperrige Substituenten die Rotation um die Csp^2-Csp^2 -Achse behindert ist. Rotationskonformere (Rotamere) um eine Csp^2-Csp^3 -Bindung wurden erstmals von SIDDAL und STEWART (247) isoliert. In der Folgezeit wurden weitere Beispiele beschrieben (248). Für Procyanidine hatten WEINGES und Mitarb. (249,250), sowie DREWES und Mitarb. (251,252) Behinderung um die C4-CS"-Bindung der Catechinmonomeren festgestellt. Die erstgenannten Autoren haben das an 4-Aryl-Flavanen studiert, wobei sie die Temperaturabhängigkeit der OCH_3 -Signale im NMR-Spektrum verfolgt haben (250).

Zur Bestätigung der chemischen Konstitution konnte ein C-13-NMR-Spektrum (Abb. 109, S. 160) wertvolle Beiträge liefern. Zu diesem Zweck wurde zuerst ein CMR-Spektrum von Strobopinin und Kryptostrobin in DMSO aufgenommen. Durch Vergleich mit anderen Flavanonen, wie z.B. Pinocembrin, konnten alle Peaks der C-Methylflavanone zugeordnet werden (253,254). Wie aus Tabelle 22, Seite 158, ersichtlich, sind alle dem Strobopiningerüst zugehörigen Werte im Melanervin-Spektrum zu den authentischen Strobopininwerten in Beziehung gebracht.

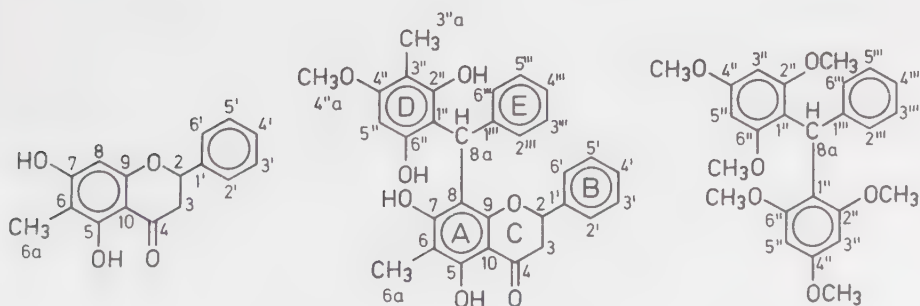
Andererseits wurden die verbleibenden C-13-Signale mit der Modellverbindung Bis-(2,4,6-Trimethoxyphenyl)-phenyl-methan verglichen (255,256).

Einige Peaks, die im Bereich der D-Ring-Kohlenstoffe zusätzlich auftreten, können von epimeren oder konformeren Formen stammen.

T a b e l l e 22 : ^{13}C -NMR-Zuordnung

Strobopinin			Melanervin	
C-6a	$\delta =$	7.0 ppm	$\delta =$	7.5 ppm bezogen auf TMS
C-3		42.2		40.5
C-2		78.4		82.0
C-8		94.5		106.2
C-10		101.9		102.2
C-6		102.1		103.9
C-2', 6'		126.5		126.6
C-3', 4', 5'		128.5		128.3
C-1'		139.5		138.7
C-5		160.0		159.2
C-9		161.7		158.0
C-7		165.2		162.9
C-4		196.4		197.2

TPhM		Melanervin		
C-8a	$\delta =$	37.0 ppm	$\delta =$	34.2 ppm
C-4" a		54.9		55.2
C-3", 5"		91.7		92.6
C-1"		114.0		103.9
C-4"		123.6		125.1
C-3"', 5'''		126.5		127.3
C-2"', 6'''		127.3		128.3
C-1'''		145.1		142.6
C-4"		158.6		156.8
C-2", 6"		159.2		153.8
C-3" a		-		8.7



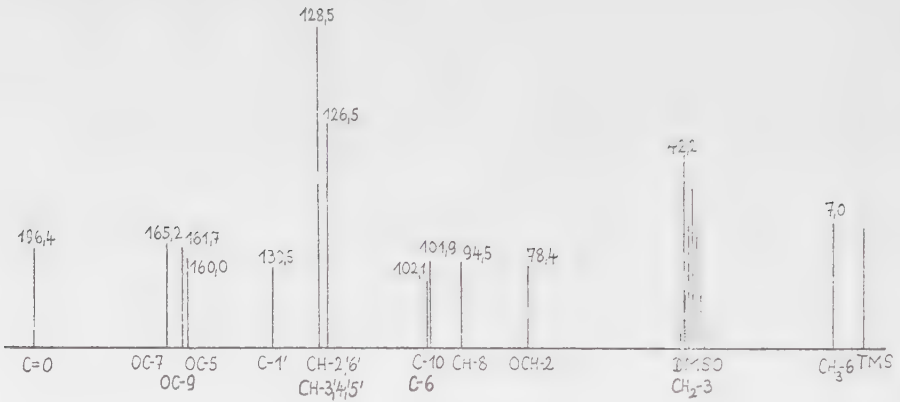


Abb. 107
¹³C-NMR-Spektrum von Strobopinin
 (Breitband - Protonen entkoppelt)

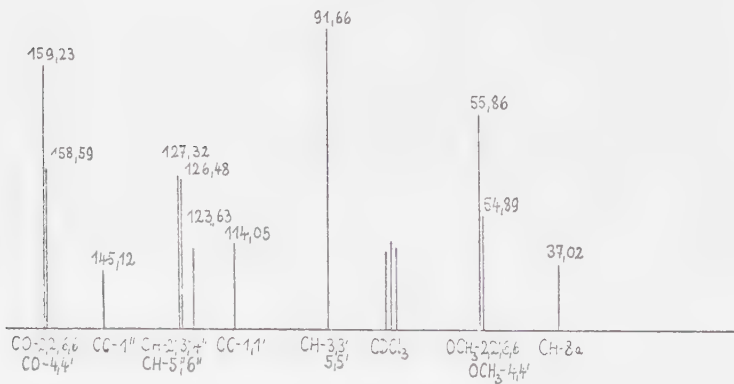


Abb. 108
¹³C-NMR-Spektrum von Bis-2,4,6-trimethoxyphenyl-phenylmethan
 (Breitband - Protonen entkoppelt)

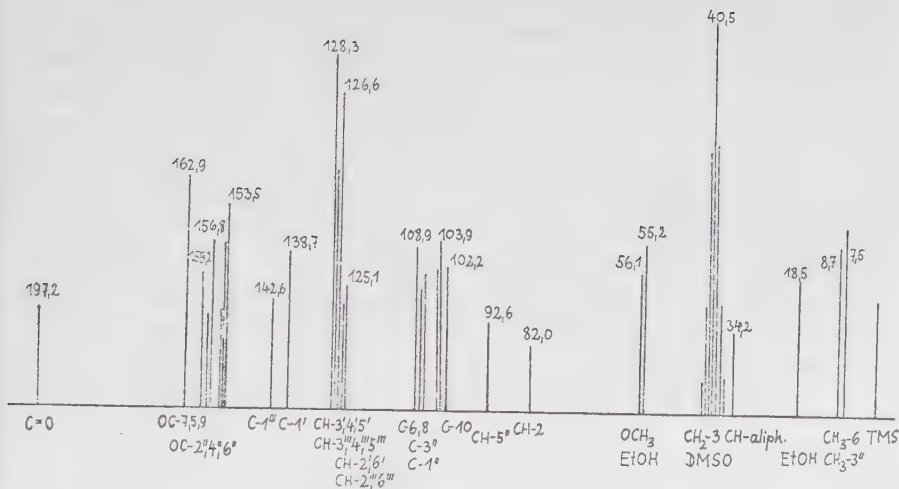


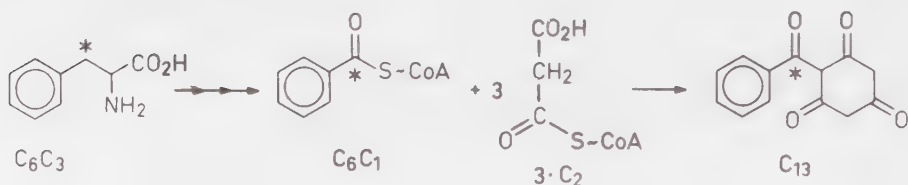
Abb. 109
 ^{13}C -NMR-Spektrum von Melanervin
 (Breitband-Protonen entkoppelt)

Zur Frage der Stereochemie von Melanervin ist festzustellen, daß der Wert der optischen Drehung von $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -4.8^\circ$ für ein Flavanon relativ gering erscheint, da anzunehmen ist, daß 2S-Konfiguration vorliegt. Die Ursache dafür könnte in einer Racemisierung oder in dem zweiten Chiralitätszentrum am C-9 zu suchen sein, welches evtl. einen positiven Beitrag liefert. Versuche, dieses durch Eliminierung der C-2 Asymmetrie zu ermitteln, führten zu keinem positiven Ergebnis, da die optische Drehung von Melanervin-chalkon-pentamethyläther vermutlich infolge Racemisierung praktisch gleich Null gefunden wurde. Somit muß die relative und absolute Konfiguration von Melanervin weiteren Ermittlungen durch Circular dichroismus und Röntgenstrukturanalyse überlassen bleiben^{*)}.

*) Eine in unserem Arbeitskreis nachisolierte Probe von Melanervin zeigte weder eine optische Drehung noch einen Cotton-Effekt.

7. Zur Biosynthese von Melanervin

Aufschlußreich für die Formulierung eines möglichen Biosyntheseweges für Melanervin ist das Vorkommen von Benzophenonen, wie z.B. 6-Hydroxy-2,4-dimethoxy-3-methyl-benzophenon und dessen 2-Hydroxy-4,6-dimethoxy-Isomeren in *Leptospermum luehmannii* - (212) einer Melaleuca nahestehenden Gattung. Aus dem Substitutionsmuster dieser Inhaltsstoffe ist bereits zu vermuten, daß Verbindungen dieses Typs aus drei Acetateinheiten und einem Phenylpropan aufgebaut werden. Benzophenone wurden auch als Zwischenstufen bei der Xanthon-Biosynthese nachgewiesen (257). Aus Markierungsversuchen gilt in diesem Fall als erwiesen, daß der C_6C_1 -Körper aus dem Shikimisäure-Stoffwechsel und nicht aus dem Acetat-Malonat-Weg stammt.



C- und O-Methylierungen auf der Grundlage von S-Adenosylmethionin (SAM $\longrightarrow$ SAH) finden nachträglich statt (258). Auch die Stilbene, die in Myrtaceen vorkommen, stehen zu den Benzophenonen in naher biogenetischer Beziehung (259,260). Spekulativ kann man annehmen, daß das methylierte C₁₅-Keton vom Kotointyp - evtl. zum Carbinol reduziert - anschließend mit dem CH-8 des Flavanons nach Art der Selbstkondensation der Proanthocyanidine kondensiert wird (261,262).

Das Flavongerüst wird bekanntlich in vivo in der Pflanze aus Malonyl-CoA und Cinnamoyl-CoA gebildet (BIRCH (263), GRISEBACH (264)).

mit der Struktur eines 5,7-Dihydroxy-flavanonyl-8-(4-hydroxy-5-methyl-6-äthyl)-pyron-2-yl-3-methan.

Flavan-4-ole kondensieren nach WEINGES (275) in vitro leicht mit Phenolen infolge der Nukleophilie der C₈-bzw. der Elektrophilie der C₄-Position. KENYON und Mitarb. (276) synthetisierten aus Benzylalkoholen u.a. auch Triphenylmethanderivate.

Ebenso läßt sich nach HUFFORD und LASSWELL (273) mit Hilfe von Bortrifluorid direkt Pinocembrin mit o-Hydroxybenzylalkohol zu C-Benzyl-Produkten kondensieren, wie z.B. bei der C-Prenylierung beschrieben (277). Denkbare Synthesewege für Melanervin können also wie folgt konzipiert werden:

- a) Kondensation von C-Methyl-phloracetophenon mit einem entsprechend substituierten Benzhydrol zum Triphenylmethanderivat und dessen Aufbau zum Chalkon-Flavanon (278).
- b) Metallierung von 8-Brom-Strobopinin-dimethyläther mit Butyllithium zur 8-Lithiumverbindung und anschließende Alkylierung derselben mit einer geeigneten Benzophenonverbindung zum Triphenylcarbinol.

Versuche in dieser Richtung sind im Gange.

Z U S A M M E N F A S S U N G

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die massenspektroskopische Analyse polyphenolischer pflanzlicher Glykoside um ca. 150 Beispiele erweitert. Hierbei konnten bestehende Regeln bestätigt und verschiedene neue Gesetzmäßigkeiten gefunden werden:

1. Über die Permethylderivate ergaben sich neue Möglichkeiten der Differenzierung von Flavonoid-diglykosiden mit verschiedenen Zuckeranteilen oder mit furanoiden Monosaccharid-Resten sowie zur Lokalisierung von Acylgruppen.
2. Die systematische MS-Analyse permethylierter Anthrachinon-, Xanthon- und Cumarin-O-glykoside sowie von Anthocyaninen zeigte, daß diese gleichermaßen zur Identifizierung geeignet sind. Keine dieser Glykosidklassen ist bis jetzt durch MS ihrer Permethylylprodukte untersucht worden.
3. Durch die charakteristische Fragmentierung der Glykosid-Peracetate wurde nachgewiesen, daß diese zur Strukturaufklärung sowohl ihrer Aglykon- als auch Glykonbestandteile herangezogen werden können.
4. Für Polyphenolglykoside wurde ein Analysengang zu Methylierungsanalysen ausgearbeitet, der für die Zuckerbestimmungen mehr Sicherheit bietet. Hierbei wurden als Zuckerderivate erstmals Phenyl-O-glykoside und N-Phenyl-glykosylamine zur GC-MS verwendet.
5. Neu ausgearbeitete Methoden der GC-MS-Identifizierung von Flavonoid-Abbauprodukten ergänzten die Analyse von Aglyka mit ungewöhnlicher Substitution und ermöglichten eine systematische Bearbeitung verschiedener Flavonoidklassen im Mikromaßstab.

Aus *Melaleuca quinquenervia* wurde neben den bekannten C-Methylflavanonen Strobopinin und Kryptostrobin ein neues Polyphenol - Melanervin - isoliert und seine Strukturaufklärung bis auf einige offene stereochemische Fragen durchgeführt. Sie erfolgte durch GC-MS seiner Abbauprodukte und Derivate im Mikromaßstab sowie durch Protonen- und C-13-NMR-Spektroskopie. Bei dieser Verbindung handelt es sich um das erste im Pflanzenreich aufgefundene Triphenylmethanderivat mit der Konstitution eines 2,4-Dihydroxy-6-methoxy-tolyl-3-(5,7-dihydroxy-6-methyl)-flavanonyl-8-phenylmethan.

EXPERIMENTELLER TEIL

I. Allgemeine physikalisch-chemische Verfahren

1. Substanztrocknung

Die Trocknung der Proben erfolgte in elektrisch geheizten Trockenpistolen entweder bei Wasserstrahl-Vakuum über P_2O_5 oder im Hochvakuum bei 10^{-5} Torr bis zur Gewichtskonstanz.

2. Schmelzpunktsbestimmungen

Nach Trocknung der zu prüfenden Substanzen bei angepaßten Temperaturen wurden ca. 0.1 mg Substanz zwischen Objektträger und Deckglas auf dem Kofler-Mikroheiztisch der Fa. Reichert erhitzt und das Schmelzverhalten mit dem Stereomikroskop beobachtet. Die Schmelztemperaturen wurden an dafür geeichten Thermometern abgelesen und sind bereits korrigiert.

3. Polarimetrische Messungen

Die Bestimmung der optischen Drehungen erfolgte im Lichtelektrischen Polarimeter LEP A2 der Fa. Zeiss bei den Hg-Linien 365, 405, 436, 546 und 578 nm sowie Raumtemperatur. Die Umrechnung auf die Na-D-Linie 589 nm geschah mit Hilfe der Formel:

$$\alpha_{589} = \frac{\alpha_{546} - \frac{\alpha_{578}}{1.373}}{\alpha_{546} - \alpha_{578}} \cdot \alpha_{546}$$

Die Einwaage betrug ca. 10 mg/2 ml entsprechend ca. 0.5%igen Lösungen. Polarimeterrohr: d = 0.5 dm, i.D. 6 mm.

4. Osmometrische Molekulargewichtsbestimmungen

Die osmometrischen MG-Bestimmungen wurden mit einem thermoelektrischen Dampfdruck-Osmometer VPO 301A der Fa. Hewlett-Packard durchgeführt. Die Einwaage betrug 2 - 5 mg/ml in Benzol p.a. oder Aceton p.a. Als Bezugssubstanz diente Benzil bei verschiedenen Konzentrationen. Thermistorsonde bei 37° , Wartezeit 2 min.

5. Elementaranalysen

Die Mikro-CHN-Verbrennungsanalysen erfolgten im CHN-Analysator 185 der Fa.Hewlett-Packard bei einer Einwaage von 0.6 - 0.8 mg. Nach GC-Trennung der Verbrennungsprodukte N_2 , CO_2 und H_2O an einer Molekularsieb-Säule im Helium-Strom und WLD-Detektion erfolgte die Auswertung durch einen Integrator 3370B der Fa.Hewlett-Packard in Relation zu geeigneten Referenzsubstanzen.

6. pH-Messungen

Für pH-Messungen wurde ein pH-Meter E 300B der Fa.Metrohm verwendet. Als Eichlösungen dienten Phosphatpuffer pH = 7.0 und Acetatpuffer pH = 4.2.

7. Elektrometrische Endpunktstitrationen

Die elektrometrische Endpunktsindikation bei Titrationen erfolgte mit einem Combititrator 3 D der Fa.Metrohm, bestehend aus pH-Meter E 300 B, Impulsomat E 473, Polarizer E 456 und Dosimat.

Verwendet wurden die Elektroden:

- a) Kombinierte Platin-Silberchlorid Elektrode EA 277
- b) Kombinierte Glas-Silberchlorid Elektrode EA 121/X
- c) Kombinierte Silber-Silberchlorid Elektrode EA 246
für potentiometrische Titrationen
- d) Doppelplatinelektrode 5 mm Ingold
für amperometrische dead-stop-Titrationen

Die Mikro-Wasser-Bestimmung nach Karl Fischer, sowie die Mikro-Methoxy-Bestimmung nach Zeisel und die Mikro-Acetyl-Bestimmung nach Schöniger erfolgten mit 2 - 4 mg Substanz.

II. Spektroskopische Methoden

1. UV-VIS-Spektren

Die Spektren im UV- und sichtbaren Bereich wurden mit dem Spektrophotometer DK - 2A der Fa. Beckman aufgenommen.

Einwaage: ca. 0.5 mg/50 ml MeOH p.a.

Lichtweg: Quarzküvetten 1 cm gegen Methanol p.a.

Typische Geräteparameter:

Skalenspreizung 1x, Empfindlichkeit 20, Zeitkonstante 0.2

Vorschub 60 nm/min, 10 nm/cm, Extinktionsbereich 0 - 1

2. IR-Spektren

Die IR-Spektren wurden mit dem IR-Spektrophotometer IR-8 der Fa. Beckman aufgenommen.

Einwaage: 1.0 - 1.5 mg auf 100 - 150 mg KBr als 13 mm Ø KBr-Preßlinge präpariert.

Typische Geräteparameter:

Speed 8 1/2 min/scan, Gain 5

3. NMR-Spektren

Die ^1H -CW-NMR-Spektren (PMR) wurden mit dem Kernresonanzspektrometer A- 60 A der Fa. Varian bei 60 MHz aufgenommen. Die Lösungen hatten Konzentrationen von 1 - 30 mg auf 50 - 400 µl Lösungsmittel. Als Solventien dienten überwiegend DMSO- d_6 99.5%ig und CHCl_3 - d_1 99.8%ig.

Zur Verbesserung der Signal-Rausch-Verhältnisse diente ein Digital-Signal-Averager 547 der Fa. Ortec, wobei 9 bis 36 Scans akkumuliert wurden.

Typische Geräteparameter waren:

Sweep-Bereich 500 Hz bei 250 sec. Filterbandbreite 2 Hz
RF-Feld 0.04 mG, Spektrum Amplitude 32 - 100, Integration bei 0.1 mG und 25 sec.

Die ^{13}C -FT-NMR-Spektren (CMR) wurden mit dem Kernresonanzspektrometer XL-100 der Fa. Varian bei 25.2 MHz bzw. WX-90 FT der Fa. Bruker bei 22.63 MHz aufgenommen.

Die Konzentrationen der Lösungen lagen hier bei 50 - 100 mg pro 0.5 ml in 5 mm Ø Probenröhrchen.

Typische Geräteparameter waren:

Deuterium-Lock 15.4 MHz, Spin-Rate 10 rps, Scans 10 000 -

20 000, Sweep Width 50 - 100, Sweep offset 12 000 - 18 000,
Puls-Breite 5.0 μ sec, Speicher 8 K,
Spektrum- Amplitude 50/3

4. Massenspektren

Die Massenspektren wurden mit dem doppelfokussierenden Massenspektrometer MS 30 (Einstrahlversion) der Fa. AEI aufgenommen. Die Proben wurden in μ g-Mengen in 10 x 1.6 mm Glasröhrchen, über den Direkteinlaß eingeschleust, in die Elektronen-Stoß-Ionenquelle gebracht.

Probenstab-Temperatur bis 300°.

Die Aufzeichnung der Spektren erfolgte durch einen UV-Galvanometer-Schreiber F 10- 430 S der Fa. Shandon.

Typische Geräteparameter:

Auflösung ca. 1000 (10% Tal-Def.)

Ionenquelle: Beschleunigungsspannung 4 und 2 KV, Elektronen-Energie 70 oder 20 eV, Trap-Strom 100 - 300 μ A, Ionenquellentemperatur 50 - 250°, Vakuum 10^{-6} Torr.

Kollektor: SEV lin oder log, Gain 10^6 , Vakuum 5×10^{-7} Torr, Scan-Geschwindigkeit 10 od. 30 sec/dec.

Die Massenbestimmung erfolgte manuell mit Hilfe von Referenzsubstanzen auf dem Schrieb.

Für die integrierte GC-MS-Kombination diente ein geheiztes Interface mit Solvent-Vent-Valve und Membran-Separator, welche bei 150 - 250° betrieben wurden.

Ein heizbares Referenz-Einlaß-System diente zum Dosieren von Perfluorkerosin oder 2,4,6-Tris-(pentadecafluorheptyl)-1,3,5-triazin zur Probe. Der Total-Ionenstrom wurde durch einen XT-Potentiometerschreiber Servogor M der Fa. Metrawatt bei 10 - 20 mV Eingangsspannung und 1 cm/min. Papier-vorschub aufgezeichnet.

III. Chromatographische Arbeitsmethoden

1. Analytische Dünnschichtchromatographie

Sorptionsmittel

a) Kieselgel (K)

Verwendet wurden Fertigplatten 60 F-254 der Fa. Merck, 20 x 20 cm Glas oder kleiner, Schichtdicke 0.25 mm.

b) Polyamid (P)

Verwendet wurden Fertigplatten F 1600 der Fa. Schleicher und Schüll, 20 x 20 cm Glas oder kleiner, Schichtdicke 0.3 mm und Fertigfolien Mikropolyamid F 1700 der Fa. Schleicher und Schüll, 20 x 20 cm Plastik oder kleiner, Schichtdicke 0.15 mm

c) Cellulose (C)

Verwendet wurden Fertigplatten F der Fa. Merck 20 x 20 cm Glas oder kleiner

Die Substanzgemische wurden punkt- oder strichförmig mit Schmelzpunkt-Kapillaren aufgetragen.

Laufmittelsysteme

Polyphenole und Phenolcarbonsäuren

Dichloräthan-Äthylacetat-Eisessig 8:1:1 (K)

Äther-Benzin-Aceton 5:5:1 (K)

Chloroform-Eisessig-Wasser 50:45:10 (K)

Toluol-Propanol-Eisessig-Wasser 15:18:10:5 (K)

Methanol (P)

Oxy-Zimtsäuren

Toluol-Eisessig-Wasser 4:1:5 (Oberphase) (K,C)

Methylierungsprodukte

Benzol-Aceton 9:1 (K)

Benzol-Äthylacetat 6:5 (K)

Acetylierungsprodukte

Benzol-Methanol 95:5 (K)

Glykoside und Glucuronide

n-Butanol-Eisessig-Wasser 4:1:5 (Oberphase) (K,C)

Benzol-Pyridin-Ameisensäure 36:9:5 (C)

Methanol-Wasser 6:4 (P)

PM-Glykoside

Benzol-Aceton 2:1 (K)

Äthylacetat (K)

Chloroform-Aceton 8:2 (K)

PA-Glykoside

Toluol-Äthylacetat 5:4 (K)

Zucker

n-Butanol-Pyridin-Wasser 35:20:15 (C)

Äthylacetat-Methanol-Eisessig-Wasser 60:15:15:10 (K)

Methylzucker

Benzol-Äthanol 8:2 (K)

Zuckeracetate und Alditolacetate

Benzol-Äthylacetat 5:4 (K)

Als Entwicklungskammern dienten rechteckige Trogkammern der Ausmaße 22 x 22 x 10 cm unter Kammersättigung.

Detektionsmittel

Die entwickelten DC-Platten wurden nach dem Trocknen unter dem UV-Licht beurteilt und anschließend mit einem der folgenden Reagenzien besprüht.

Phenolische Verbindungen

Echtblausalz-B-Reagens (Tetraazotiertes Di-O-anisidin-Zink-Doppel-Salz)

Paulys Reagens (Diazotierte Sulfanilsäure-Lösung)

Gibbs Reagens (2,6-Dibromchinonchlorimid)

Emersons Reagens (4-Aminoantipyrin)

Neus Naturstoff-Reagens modifiziert (279) (Diphenylborsäure- β -amino-äthylester)

Eisen-III-chlorid-Lösung

Basische Bleiacetat-Lösung

Antimon-III-chlorid-Lösung

Folin-Ciocalteu-Reagens (Phosphormolybdänwolframsäure)

Bromphenolblau-Lösung (α, α -Bis-(3,5-dibromo-4-hydroxyphenyl-)
 α -hydroxy-o-toluolsulfonsäure)

methanolische Kalilauge

Phenolcarbonsäuren

Bromkresolgrün-Reagens (α, α -Bis-(3,5-dibromo-4-hydroxy-o-tolyl)
 α -hydroxy-o-toluolsulfonsäure)

Phenolcarbonsäure-Ester

Hydroxylamin-Eisen-III-chlorid-Lösung

Ketone, Aldehyde

2,4-Dinitrophenylhydrazin-Lösung

Acetate, Alkohole

Vanillin-Schwefelsäure

Zucker, Methylzucker

Anilinphthalat-Lösung

Diphenylamin-Phosphorsäure (280)

Anisaldehyd-Schwefelsäure

Thymol-Schwefelsäure (281)

Anilin-Phosphorsäure

Steroide, Triterpene

Liebermann-Burchard-Reagens (Essigsäureanhydrid-Schwefelsäure)

Die Sprühreagenzien wurden - falls nicht anders angegeben - nach STAHL (282) angefertigt und verwendet bzw. fertig aus dem Handel bezogen.

2. Präparative Dünnschichtchromatographie

Sorptionsmittel

Verwendet wurden

- a) Kieselgel-Fertigplatten 60 F 254 der Fa.Merck, 20 x 20 cm Glas, Schichtdicke 0.5 mm.

Die Substanzgemische wurden zu ca. 1 mg pro Platte strichförmig auf die mit dem jeweiligen Laufmittel gewaschenen Platten aufgetragen. Sie dienten zur mikropräparativen Gewinnung von Reinsubstanzen für die Massenspektroskopie im μ g-Bereich.

- b) Kieselgelplatten, selbstbereitet

15 g Kieselgel 60 HR reinst nach STAHL der Fa.Merck wurden in 30 ml H_2O eingerührt und nach 15 min Quellen 5 min lang streichfähig gerührt und auf 20 x 20 cm Glasplatten gleichmäßig verteilt.

Die Substanzgemische wurden zu ca. 10 - 20 mg pro Platte bandförmig mit der Blutzuckerpipette aufgetragen, nachdem die lufttrockenen Platten mit dem jeweiligen Laufmittel gewaschen worden waren. Sie dienen zur semimikropräparativen Gewinnung von Reinsubstanzen in mg-Mengen für die NMR- und IR-Spektroskopie.

Laufmittelsysteme

Siehe oben.

Die aufgetrennten Zonen wurden unter dem UV-Licht markiert und von den Platten geschabt, die Schichten in Reagenzgläser überführt und mit Hilfe eines Rührgerätes (Whirlmix) mit Chloroform oder Aceton eluiert. Nach Filtrieren oder Zentrifugieren wurde das Solvens am Rotationsverdampfer abgezogen.

3. Säulenchromatographie

Sorptionsmittel

Verwendet wurden

- a) Kieselgel 60 der Fa. Merck, Korngröße 0.2 - 0.5 mm (35-70 Mesh), das mit dem jeweiligen Elutionsmittel in die mit Watte versehene Säule eingeschlämmt wurde. Die Füllung wurde mit Rundfilterpapier abgedeckt und mit dem jeweiligen Laufmittel gewaschen.
 - b) Sephadex LH 20 der Fa. Pharmacia (Hydroxypropyl-Polysaccharid) Korngröße 25 - 100 μm , Ausschlußgrenze 4000, das mit dem jeweiligen Elutionsmittel aufgeschlämmt und zur Quellung über Nacht stehen gelassen wurde. Die Suspension wurde unter Vermeiden von Luftblasen in einem Guß in die mit Watte beschickte Säule gebracht. Um eine einheitliche Packung zu erzielen, wurde die Säule mit Hilfe eines Vibrators gerüttelt. Dann wurde die Füllung mit Rundfilterpapier abgedeckt und mit dem jeweiligen Laufmittel gewaschen.
- Die Substanzgemische wurden als gesättigte Lösungen zu 2 - 5 ml mit der Pipette auf die Säule gegeben. Tropfgeschwindigkeit 10 - 20 Tropfen pro min bei einem inneren Säulendurchmesser von 2 - 4 cm. Die Fraktionen dienen zur präparativen Gewinnung von Reinsubstanzen im mg-Bereich.

Laufmittel

Siehe oben.

4. Gaschromatographie

Die Gaschromatographie wurde mit einem Doppelsäulengerät Fractovap 2200 der Fa. Carlo-Erba-Science durchgeführt.

Trägergas: Helium

Ofentemperatur: Isotherm oder linear programmiert 3 - 5⁰/min

Einspritztemperatur: Die Injektorblocktemperatur war gleich der Detektortemperatur ca. 30⁰ über der max.Ofentemperatur.

Einspritzmenge: 3 - 5 µl ca. 1%iger Lösungen in Aceton oder Chloroform.

Säule I: Ausgangssplitter 1:10 (Spülgas 1 atü)

Detektor: FID mit XT-Potentiometerschreiber

Speedomax XL 681 der Fa. Leeds u. Northrup.

Säule II: Der Säulenausgang konnte über ein heizbares Interface-System on-line mit der Ionenquelle des Massenspektrometers MS-30 verbunden werden.

Detektor: TIC-Monitor des Massenspektrometers.

Säulenmaterial: Gepackte Glassäulen vom Querschnitt 6 x 3 mm

- a) 2 m Länge, 3% HI-EFF 8BP auf Gas-Chrom Q 100-120 M
(Cyclohexan-dimethanol-succinat-polyester)
- b) 2 m Länge, 10% UCCW 982 auf Chromosorb WAW DMCS 80-100 M
(Methyl-vinyl-Silicongummi-polymer)
- c) 1.4 m Länge, 3% ECNS-M auf Gas-Chrom Q 100-120 M
(Äthylenglykol-succinat-cyanoäthyl-siliconpolyester-Copolymer)

Typische Geräteparameter:

Schreiber-Eingang 1 mV, Papiervorschub 0.5 cm/min, Abschwächung 16, Durchflußrate 60 ml He/min (2 atü)

Ofentemperatur 150 - 250⁰

Einspritztemperatur 280⁰

Zum Auffangen von Fraktionen im µg-Bereich für die MS diene folgende mikropräparative Methode: An die Ausgangsdüse der Säule I wurden Glas-Probenröhrchen der Größe 10 x 1.6 mm, 1 mm i.D. über ein Teflonröhrchen angeschlossen und mit einer durch Trockeneis gekühlten schweren Metallpinzette fixiert, während dessen der Peak durch den Schreiberausschlag angezeigt wurde. Das Auffangen des Kondensats einer bestimmten Fraktion konnte einige Male wiederholt werden. Das Probenröhrchen wurde dann mit Hilfe des Probenstabs in die Ionenquelle des Massenspektrometers gebracht.

IV. Allgemeine chemische Arbeitsmethoden

1. Saure Hydrolysen (Glykosidspaltung)

Ca. 10 mg Substanz wurden in 5 ml Methanol p.a. und 10 ml 10%iger Schwefelsäure auf dem Dampfbad 1 - 10 Stdn. rückflußgekocht. Nach Abdestillieren des Methanols wurde der ausgefallene Niederschlag abfiltriert und getrocknet.

2. Alkalische Hydrolysen (Esterspaltung)

Ca. 10 mg Substanz wurden in 5 ml Methanol-Chloroform p.a. gelöst und mit 5 ml 0.5 N Natriummethylatlösung p.a. 10 Stdn. bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach Neutralisieren mit Eisessig wurde mit Wasser verdünnt. Der ausgefallene Niederschlag wurde abfiltriert, mit Wasser gewaschen und getrocknet.

3. Acetylierungen

a) mit Pyridin-Acetanhydrid

Ca. 10 mg Substanz wurden in 0.5 ml Pyridin p.a. (wasserfrei) gelöst und mit 0.5 ml Acetanhydrid p.a. versetzt. Nach 12 Stdn. Stehen bei Raumtemperatur wurde das Reaktionsgemisch in 20 ml Eiswasser (dest. H_2O) eingerührt. Nach Absetzen des flockigen weißen Niederschlags wurde abgesaugt, mit Wasser gewaschen und im Exsiccator getrocknet.

b) mit Natriumacetat-Acetanhydrid

Ca. 10 mg Substanz wurden in 1 ml Acetanhydrid p.a. gelöst bzw. aufgeschlämmt und nach Zugabe von 10 mg Natriumacetat wasserfrei p.a. 1/2 Stde. auf dem Dampfbad unter Rückfluß erhitzt. Die Lösung wurde in 20 ml Eiswasser eingerührt, wobei sich ein Öl absetzte. Hieraus bildete sich durch Rühren mit dem Glasstab ein kristalliner Niederschlag, der wie üblich aufgearbeitet wurde.

c) mit Zink-II-chlorid-Acetanhydrid (283)

Ca. 10 mg Substanz wurden in 1 ml Acetanhydrid p.a. und 10 mg Zink-II-chlorid wasserfrei p.a. zur Reaktion gebracht. Nach 12 Stdn. Stehen bei Raumtemperatur wurde die Reaktionslösung kurz aufgeköcht, in Eiswasser eingerührt und wie üblich aufgearbeitet.

4. Methylierungen

a) mit Dimethylsulfat (284)

Ca. 20 mg getrocknete Substanz wurden in 5 ml Aceton p.a. (wasserfrei) gelöst und 100 mg Kaliumcarbonat wasserfrei p.a. zugegeben. Nach Zutropfen von 0.2 ml Dimethylsulfat (frisch destilliert) wurde die Mischung am Magnetrührer unter Rückfluß und Feuchtigkeitsausschluß 1 Stde. erhitzt. Die Lösung wurde heiß von den Salzen abfiltriert und der Rückstand mit Aceton nachgewaschen. Aus dem Filtrat verblieb nach Abtrennung des Lösungsmittels ein Öl, welches mit konz. Ammoniak zur Trockne gebracht wurde. Der Rückstand wurde mit 70%igem Äthanol aufgenommen (erhitzen). Der nach dem Abkühlen ausgefallene Niederschlag wurde abgesaugt und getrocknet.

b) mit Diazomethan (285)

Ca. 20 mg Substanz wurden in einer Mischung von 27 ml Äther und 3 ml Methanol gelöst und durch diese Lösung frisch bereitetes Diazomethan geleitet. Diazomethan wurde aus einem Gemisch von 1.5 g N-Methyl-N-nitroso-p-tolylsulfonamid (MNSA Merck)(286), 3 ml Äther, 3 ml 60%iger KOH und 5 ml Glykolmonoäthyläther entwickelt und mit Hilfe eines Stickstoffstromes in die Ätherlösung geleitet. Das Ende der Reaktion wurde durch Gelbfärbung der Lösung erkannt. Nach Abtrennen der Lösungsmittel wurde der Rückstand in 70%igem Äthanol aufgenommen und wie oben aufgearbeitet.

5. Silylierungen (287)

Ca. 10 mg getrocknete Substanz wurden in 0.5 ml Pyridin p.a. (wasserfrei) gelöst und dann mit 0.5 Hexamethyldisilazan (HMDS) und 0.5 ml Trimethylchlorsilan (TMCS) versetzt, wobei Ammoniumchlorid ausfiel. Das Pyridin wurde bei 40° am Rotationsverdampfer durch mehrmaliges Aufnehmen in Tetrachlorkohlenstoff entfernt. Hierbei sublimierte das Ammoniumchlorid teilweise ab. Der Rückstand wurde in Tetrachlorkohlenstoff gelöst, mit einer Spatelspitze wasserfreiem Natriumsulfat behandelt und abgenutscht. Nach Einengen unter Feuchtigkeitsausschluß verblieb ein sirupöser Rückstand.

6. Katalytische Hydrierungen

Ca. 20 mg Substanz wurden in 5 ml Methanol p.a. gelöst, mit einer Spatelspitze Paladium-Aktivkohle und 3 Tropfen Essigsäure versetzt und unter Wasserstoffatmosphäre (Ballon) bei Raumtemperatur 5 Stdn. am Magnetrührer gerührt. Nach Abfiltrieren über ein Kohlefilter wurde die Lösung eingeeengt und der Rückstand in einem geeigneten Lösungsmittel umkristallisiert.

Diese Verfahren dienten zur halbmikropräparativen Gewinnung von Derivaten für die Spektroskopie in mg-Mengen. Alle Reaktionen wurden dünnschichtchromatographisch verfolgt. .

V. Spezielle chemische Verfahren

1. Methylierungsanalyse von Glykosiden im Mikromaßstab

1.1 Permethylierung von Polyphenolglykosiden nach KUHN und TRISCHMANN (27-29)

Ca. 1 mg Rutin wurde nach Trocknung im Hochvakuum bei 110° und 10^{-5} Torr in einem 10 ml Schliffkolben mit 1 ml Dimethylformamid p.a. (wasserfrei) gelöst. Im Eisbad unter Stickstoffatmosphäre wurden sodann 4 mg Bariumhydroxid p.a. und 0.1 g Bariumoxid zugefügt und zuletzt am Magnetrührer 2 ml Methyljodid (frisch dest.) zugetropft. Nach Hinzufügen von 0.1 g Drierite (Calciumsulfat wasserfrei) ließen wir das Gemisch unter Stickstoff und Lichtabschluß am Magnetrührer mindestens 20 Stdn. reagieren. Anschließend wurde die Suspension mit Chloroform verdünnt und nacheinander mit Wasser, 15%iger Natriumthiosulfatlösung, 5%iger Kalilauge und wieder Wasser ausgeschüttelt, d.h. bis zur neutralen Reaktion gewaschen. Nach Abdestillieren des Chloroforms und wiederholtem Aufnehmen in Toluol wurde am Rotationsverdampfer eingengt und im Hochvakuum getrocknet. Der verbliebene Rest wurde mit der gleichen Menge wasserfreier Reagenzien und unter Feuchtigkeitsausschluß 12 Stdn. wie oben nachmethyliert. Zuletzt wurde der sirupöse Rückstand nach DC-Kontrolle zur MS verwendet.

1.2 Permethylierung von Polyphenolglykosiden nach HAKOMORI (30)

Auf 1 mg Natriumhydrid-Pulver wurden in einem 10 ml Rundkölbchen unter Stickstoffatmosphäre 0.5 ml Dimethylsulfoxid p.a. (wasserfrei) gegeben. Nach 15 min Erhitzen auf 80° am Magnetrührer wurde die Lösung von 1 mg Glykosid in 1 ml DMSO dazu pipettiert und erneut 15 min gerührt. Nach dem Abkühlen im Eisbad gaben wir unter Stickstoff 2 ml Methyljodid (frisch dest.) dazu. Diese Mischung ließen wir 2 Stdn. unter Rühren und Lichtabschluß reagieren. Hierauf wurde sie auf 10 ml Eiswasser gegossen und mit 2 x 20 ml Chloroform p.a. ausgeschüttelt. Die Chloroformphasen wurden mit Natriumsulfat wasserfrei p.a. getrocknet, filtriert und am Rotations-

verdampfer durch mehrmaliges Aufnehmen in Äther eingeengt. Zuletzt wurde der sirupöse Rückstand bei 10^{-1} Torr. nachgetrocknet und zur MS verwendet. Bei DC-Kontrolle zeigte sich meist eine unter dem UV-Licht blau fluoreszierende Hauptzone.

1.3 Permethylierung von Polyphenolglykosiden nach BRIMACOMBE (32)

Ca. 1 mg Glykosid wurden in 0.5 ml Dimethylformamid p.a. (wasserfrei) gelöst, mit 0.5 mg Natriumhydrid-Pulver versetzt und unter Stickstoffatmosphäre 10 min zur Reaktion gebracht (Gasentwicklung unter Gelb- bis Rotfärbung). Sodann wurde 1 - 2 ml Methyljodid frisch destilliert zugegeben und unter Stickstoff-Atmosphäre und Lichtausschluß sowie gelegentlichem Umschütteln bei Raumtemperatur stehen gelassen. Das Ende der Reaktion kündigte sich durch Farblosigkeit bzw. Aufhellung der Lösungen an. Überschüssiges Solvens und Reagens wurden am Rotationsverdampfer bei 40^0 abgezogen und der Rückstand mit Äther p.a. aufgenommen, wobei Natriumjodid ausfiel. Unter Kühlung wurden dann 15 ml Wasser zugegeben und das ganze im Scheidetrichter mit 2mal 15 ml Äther p.a. ausgeschüttelt. Die Ätherphasen wurden mit Natriumsulfat siccum p.a. getrocknet, filtriert und der Äther abdestilliert. Der Rest Feuchtigkeit konnte bei 10^{-1} Torr entfernt werden. Es verblieb ein farbloser bis gelblicher sirupöser Rückstand, welcher nach DC-Kontrolle zur MS verwendet wurde. Zeigten sich mehr als eine Hauptbande bei Betrachtung des Chromatogramms im UV, wurden die Zonen durch mikropräparative DC-Technik getrennt (nach III/2) und der MS unterzogen. Im Falle der Perdeuteromethylierung wurde anstelle von Methyljodid die gleiche Menge Trideuteromethyljodid eingesetzt.

1.4 Permethylierung von PA-Glykosiden nach BRIMACOMBE

Ca. 2 mg Glykosid-Acetat wurden in 0.5 ml DMF p.a. (wasserfrei) gelöst und 3 mg Natriumhydrid-Pulver zugegeben. Unter Stickstoff-Atmosphäre ließen wir 10 min reagieren und gaben anschließend 2 ml Methyljodid (frisch dest.) dazu. Sodann stand das Gemisch bei Raumtemperatur 1 Stde. unter Stick-

stoff-Atmosphäre und Lichtabschluß. Die ganz oder teilweise entfärbte Lösung wurde wie oben aufgearbeitet.

1.5 Hydrolyse von PM-Glykosiden

a) (Variante I)

Die erhaltenen Permethylprodukte wurden in einem 10 ml Rundkölbchen mit 3 ml 10%iger Schwefelsäure p.a. auf dem Dampfbad unter Rückfluß erhitzt. Nach 2 Stdn. wurde abgekühlt, wobei sich aus der gelben Lösung ein Niederschlag absetzte, der abgetrennt und mit wenig Aceton vom Filter gelöst wurde. Nach Entfernen des Acetons konnte das jeweils partiell methylierte Aglykon zur MS verwendet werden. Die überstehende farblose Lösung wurde erneut filtriert und mit Bariumcarbonat p.a. portionsweise neutralisiert. Die Aufschlammung wurde mit Aceton p.a. in Zentrifugengläser überspült und zentrifugiert, der Bariumcarbonat-Rückstand 2mal mit Aceton aufgerührt und nachzentrifugiert und die gesammelten Lösungen schließlich am Rotationsverdampfer vom Aceton befreit. Es verblieb eine schwach gelbliche Flüssigkeit.

Methanolyse von PM-Glykosiden

b) (Variante II für säureunlösliche Permethylprodukte)

Der bei der Permethylierung resultierende harzige Rückstand wurde in einem 10 ml Rundkölbchen in 1 ml Methanol p.a. gelöst und mit 1 ml 10%iger Schwefelsäure p.a. 2 Stdn. auf dem Dampfbad unter Rückfluß erhitzt. Nach Abdampfen des Methanols am Rotationsverdampfer flockte das partiell methylierte Aglykon aus. Anschließend wurde der Inhalt des Kolbens nochmals 15 min am Dampfbad erhitzt und nach Abkühlen filtriert. Unter Nachwaschen des Filters mit Wasser wurde die Lösung zugleich verdünnt. Die Rückstände an Glaswand und Filter wurden mit wenig Aceton gelöst und nach Einengen in der Kälte zur MS verwendet. Beim Erwärmen der Acetonlösungen tritt leicht Entmethylierung an chemisch labilen Methoxy-Positionen ein.

Die saure, wässrige Lösung (ca. 5 ml) wurde mit dem basischen Anionenaustauscher Dowex 2-X8 p.a. (50-100 M) (Benzoldimethyl-(2-hydroxyäthyl)-ammonium-Polystyrolharz, OH-Form) portionsweise bis pH 6 - 7 neutralisiert. Der Ionenaustauscher wurde abfiltriert, mit Wasser und Äthanol p.a. ausgewaschen und in einem 50 ml Rundkolben auf ca. 5 ml eingengt, wobei eine schwach gelbliche Flüssigkeit zurückblieb.

1.6 Reduktion von Aldosemethyläthern zu O-Methylalditolen

a) (Variante I)

Ein aliquoter Teil der neutralisierten Lösung der partiell methylierten Zucker wurde mit 5 mg Natriumborhydrid versetzt und bei Raumtemperatur im Dunkeln 1 Stde. stehen gelassen. Nach dieser Zeit wurden erneut 5 mg Natriumborhydrid zugegeben und 1 Stde. zur Reaktion gebracht. Anschließend wurde der Überschuß davon mit 0.5 ml Essigsäure zerstört. Die Lösung wurde unter Zugabe von 3mal 5 ml Methanol p.a. zur Trockne eingengt. Nachtrocknung erfolgte an der Rotationspumpe bei 10^{-1} Torr.

Reduktion von Aldosemethyläthern zu O-Methylalditolen

b) (Variante II)

Ein aliquoter Teil der Methylzucker wurde mit 5 mg Natriumborhydrid versetzt und 2 Stdn. bei Raumtemperatur im Dunkeln stehen gelassen. Anschließend neutralisierten wir durch spatelweise Zugabe des sauren Kationenaustauschers Dowex 50W-X8 p.a. (100-200 M) (Sulfonat-Polystyrol-Harz, H-Form) und filtrierten vom Austauscher. Unter Nachwaschen mit Wasser und Methanol in einen 50 ml Schliffkolben wurde eine klare Lösung erhalten, die durch 3malige Zugabe von 5 ml Methanol p.a. am Rotationsverdampfer eingengt wurde. Es verblieb ein gelblicher Rückstand, der an der Rotationspumpe nachgetrocknet wurde.

Im Falle der deuterierenden Reduktion wurde anstelle von Natriumborhydrid die gleiche Menge Natriumbor-deuterid verwendet.

1.7 Acetylierung von Alditolmethyläthern zu O-Methylalditolacetaten

Die getrockneten Rückstände der partiell methylierten Zuckeralkohole wurden in 0.5 ml eines 1:1 Gemisches von Pyridin-Acetanhydrid p.a. gelöst und mindestens 2 Std. bei Raumtemperatur stehen gelassen. Zugewogen wurde am Dampfbad kurz erhitzt und ca. 10 ml Eiswasser zugegeben. Diese Lösung wurde mit 10 ml Chloroform p.a. 2mal ausgeschüttelt und die organische Phase bis auf 0.2 ml eingengt. Diese Lösung diente zur GC (3 µl).

1.8 Oximierung von Aldosemethyläthern zu Methyl-aldoxim-methyläthern und anschließende Trimethylsilylierung

Ein aliquoter Teil der neutralen Lösung der partiell methylierten Zucker wurde in einem 3 ml Spitzkölbchen zur Trockne eingengt (Rotationsverdampfer), unter Stickstoff mit 50 µl Pyridin und 2 mg Methoxyammoniumchlorid versetzt und 1 Stde. bei 80° verschlossen am Dampfbad erwärmt. Sodann wurden 50 µl BSTFA (N,O-Bis-trimethylsilyl-trifluoracetamid) (288) zugegeben und nochmals 5 min bei 80° erwärmt. 3 - 5 µl dieses Gemisches wurden zur GC-MS verwendet.

1.9 Trifluoracetylierung von Aldosemethyläthern zu O-Methylaldose-trifluoracetaten

Ein aliquoter Teil der neutralen Lösung der partiell methylierten Zucker wurde eingengt und in 100 µl Dichlormethan, 50 µl Trifluoracetanhydrid und 10 µl Pyridin p.a. (wasserfrei) zur Reaktion gebracht. Nach 3 Std. stehen bei Raumtemperatur wurde die Mischung direkt zur GC-MS verwendet.

1.10 Kondensation von Aldosemethyläthern mit Anilin zu N-Phenylglykosylamin-methyläthern

Das saure Hydrolysat der PM-Glykoside wurde wie unter V. 1.5 mit basischem Ionenaustauscher unter spatelweiser Zugabe so lange gerührt, bis die Lösung neutral bis schwach sauer war. Der Ionenaustauscher wurde abfiltriert

und 2mal mit 2 ml Wasser, zuletzt mit 3 ml Äthanol nachgewaschen. Die Lösung wurde in einem 20 ml Spitzkölbchen 3mal mit Äthanol p.a. (absolut) zur Trockne eingeengt (Rotationsverdampfer 40⁰) und mit 200 µl aufgenommen. Wir gaben 1 Tr. Anilin p.a. dazu und erhitzen 3 min am Dampfbad. Die schwach gelbe Lösung wurde sofort zur GC verwendet.

1.11 Kondensation von Aldosemethyläthern mit Phenol zu Phenyl-O-glykosid-methyläthern

a) Variante I

Ein aliquoter Teil der neutralisierten Lösung der partiell methylierten Zucker wurde wie beschrieben mit Äthanol bis zur Trockne eingeengt. Der verbliebene Rückstand wurde in 200 µl Dichloräthan gelöst und dann mit einem Kristall Phenol p.a. und einer Spur Zinn-IV-chlorid versetzt. Dieses Gemisch wurde 15 min auf dem Dampfbad erhitzt, mit Aceton wieder auf 200 µl ergänzt und diese Lösung zur GC verwendet.

b) Variante II

Ein aliquoter Teil der neutralen Lösung der partiell methylierten Zucker wurde eingeengt, getrocknet und mit einem Kristall Phenol p.a. und einer Spur p-Toluolsulfonsäure 3 min auf dem Dampfbad erhitzt. Es entstand eine rotbraune Schmelze, die in 100 µl Aceton aufgenommen wurde. Von der farblosen Lösung dienten 3 µl zur GC-Analyse.

2. Peracetylierung von Polyphenolglykosiden im Mikromaßstab

Ca. 1 mg Glykosid wurden in 0,2 ml Pyridin p.a. (wasserfrei) gelöst und mit 0,3 ml Acetanhydrid p.a. 2 Stdn. bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wurde unter Kühlung mit 10 ml Wasser versetzt und 2mal mit 10 ml Chloroform p.a. ausgeschüttelt. Die Chloroformphasen wurden gesammelt, mit Natriumsulfat sicc. p.a. getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer eingeengt. Nachetrocknung erfolgte an der Rotationspumpe bei 10⁻¹ Torr. Es verblieb ein gelblicher Sirup, der durch Reiben kristallin wurde.

3. Per-trimethylsilylierung von Polyphenolglykosiden im Mikromaßstab

Ca. 1 mg Substanz wurden unter N_2 -Atmosphäre in 50 μ l Pyridin p.a. (wasserfrei) gelöst, wobei 1 ml Stechampullen Verwendung fanden. Unter Feuchtigkeitsausschluß wurden dann 50 μ l eines 1:1-Gemisches von HMDS+TMCS zugespritzt, wobei Ammoniumchlorid ausfiel. Die Reaktionsgefäße wurden dann mittels einer Tischzentrifuge 5 min bei ca. 3000 rpm zentrifugiert, der Überstand mit einer Spritze entnommen und in einem 1 ml Schliffkölbchen mit Tetrachlorkohlenstoff wiederholt aufgenommen und eingeengt, bis ein farbloser bis gelblicher sirupöser Rückstand verblieb. Nachtrocknung an der Rotationspumpe bei 10^{-1} Torr.

Im Falle der Tri-deuteromethylsilylierung wurde die Substanz in Pyridin- d_5 gelöst und anstelle von HMDS+TMCS gleiche Volumina Hexamethyl- d_{18} -disilazan und Trimethyl- d_9 -chlorsilan verwendet.

4. Abbaureaktionen mit Polyphenolen im Mikromaßstab

4.1 Alkaliabbau von Polyphenolen mit Natronlauge

Ein 250 ml Dreihalskolben wurde mit Rückflußkühler (Calciumchloridrohr) Thermometer und Stickstoffeinleitungsrohr bestückt. 20 ml 2N NaOH wurden hierin unter Spülen mit Stickstoff 15 min auf 95° erhitzt, um die Luft auszutreiben. Sauerstofffreier Stickstoff wurde erhalten, indem man diesen durch eine mit alkalischer Pyrogallollösung gefüllten Waschflasche leitete. Dann wurde ca. 1 mg des Polyphenols zu der Lösung gegeben und 1 Stde. bei 100° unter Stickstoffdurchfluß gekocht, bis das Produkt farblos erschien. Nach Abkühlen des Kolbens wurde unter Eiskühlung langsam mit 5 ml 32%iger Salzsäure p.a. angesäuert. Das Produkt wurde im 100 ml Scheidetrichter mit 2mal 20 ml Äther p.a. ausgeschüttelt, mit Natriumsulfat sicc. p.a. getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer vom Äther befreit. Der Rückstand fand sowohl zur DC, als auch zur GC-MS-Analyse Verwendung.

4.2 Alkalisch-reduktiver Abbau von Polyphenolen mit Na-amalgam

In der gleichen Vorrichtung wie oben wurden nach Befreien der 2N Natronlauge von Luft unter N_2 -Überdruck 6 g zer-kleinertes 5%iges Natriumamalgam zugegeben und weitere 5 min erhitzt. Erst dann kamen die 1 mg Substanz in die Lösung und es wurde weiter wie oben verfahren.

4.3 Alkaliabbau von PM-Polyphenolen und PDM-Polyphenolen mit alkoholischer Kalilauge

Ca. 1 mg der Methylierungsprodukte wurden in 15 ml Äthanol p.a. gelöst und in den oben beschriebenen Dreihalskolben gebracht. Nach Durchleiten von Stickstoff wurden 5 ml einer 50%igen wässrigen KOH p.a. zugegeben und 5 Stdn. auf dem Dampfbad unter Rückfluß und N_2 -Atmosphäre erhitzt. Das Äthanol wurde am Rotationsverdampfer abdestilliert und anschließend durch Wasser ersetzt. Nach vorsichtigem Ansäuern der alkalischen Lösung mit 20%iger Salzsäure p.a. wurde 2mal mit Diäthyläther p.a. extrahiert und die Ätherphasen zuerst 2mal mit 5%iger Natriumhydrogencarbonat-Lösung, dann 2mal mit 3%iger Natronlauge ausgeschüttelt. Nach Trocknen der Ätherphase mit Natriumsulfat wasserfrei p.a. wurde bis zu einem öligen Rückstand eingeengt. Die Natriumbicarbonat-Lösung wurde mit 2N HCl angesäuert und 2mal mit 15 ml Äther p.a. extrahiert, schließlich die Ätherphasen getrocknet und am Rotationsverdampfer eingeengt. Ebenso wurde mit der NaOH-Lösung verfahren. Die drei Rückstände fanden zur GC-MS-Analyse Verwendung. Außerdem wurden die Rückstände der Säure- und Phenolfractionen zusätzlich silyliert und dann der GC-MS-Analyse zugeführt (V. 4.5)

4.4 Alkalisch-oxidativer Abbau von Polyphenolen

a) Variante I

Ca. 1 mg Substanz wurden mit 10 ml 2N NaOH p.a. unter Zugabe von 1 ml Nitrobenzol in vernickelten 20 ml-Messingbechern der Größe 8 x 3 cm, i.D. 2 cm gelöst. Die Becher wurden verschraubt und mit Hilfe einer Teflon-dichtung druckfest verschlossen. Hierauf wurden die Autoklaven im elektrisch geheizten Alu-Block 3 Stdn.

unter Schütteln auf der Schüttelmaschine auf 160° erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde der Becherinhalt in einen 100 ml Schütteltrichter filtriert und mit dest. H₂O und Äther nachgespült, sodann unter Umschwenken mit ca. 15%iger HCl bis pH 6 - 7 vorsichtig angesäuert.

Weiterhin wurde mit gleichen Volumina Äther p.a. 3mal ausgeschüttelt. Die gesammelten und mit Natriumsulfat sicc. getrockneten Ätherphasen wurden eingeengt und an der Rotationspumpe nachgetrocknet. Der braune Rückstand wurde mit 0.1 ml Aceton p.a. aufgenommen und DC überprüft.

b) Variante II

Anstelle von Nitrobenzol wurde als Oxidationsmittel 1.7 g Kupfer-II-sulfat-pentahydrat, als Solvens 10 ml 3N NaOH verwendet. Der Abbau erfolgte bei 180° über 3 Stdn., die Aufarbeitung geschah wie oben. Als Rückstand verblieb ein farbloses bis gelbes Produkt.

4.5 Trimethylsilylierung der Abbauprodukte

a) Variante I

Der gründlich getrocknete Rückstand der Abbauprodukte wurde unter Stickstoff in 1 ml Stechampullen mit 50 µl Pyridin p.a. (wasserfrei) in Lösung gebracht. Unter Feuchtigkeitsausschluß wurden dann 50 µl eines 1:1-Gemisches von HMDS und TMCS zugegeben. Die Reaktionsgefäße wurden mittels einer Tischzentrifuge 5 min bei 3000 rpm zentrifugiert. Vom Überstand wurden 3 - 5 µl für die GC verwendet.

b) Variante II

Der Rückstand wurde wie oben gelöst, sodann 50 µl N,O-Bis-trimethylsilyl-trifluoracetamid (BSTFA) zugespritzt und kräftig umgeschüttelt. Nach einigen Minuten war die Silylierung quantitativ. Feuchtigkeitsausschluß ist dabei zu beachten. 1 - 2 µl der Reaktionslösung wurden zur Gaschromatographie verwendet.

5. Strukturaufklärung von Melanervin

5.1 Herkunft der Droge

Die Blüten von *Melaleuca quinquenervia*, die zur Isolierung von Melanervin dienten, wurden im Juni 1974 in Südflorida von wild wachsenden Bäumen gesammelt. Die Blütendroge, aus der Isomelanervin stammt, wurde im November 1967 und Dezember 1970 in dem gleichen Gebiet von professionellen Sammlern gepflückt. Die Droge ist von Professor Dr. J. Morton, Miami, für uns beschafft worden. Ein Teil davon wurde über die Firma Andrew L. Manis 13601 Old Cutter Rd. Miami Florida 33158 in getrocknetem Zustand geliefert. Die Blütenähren zeigten abgeblühte Einzelblüten von gelb bis bräunlichem Aussehen. Sie waren von stark aromatischem Geruch.

5.2 Isolierung von Melanervin

Die Einzelblüten wurden von den Stielen der Infloreszenzen gestreift und im Mörser grob zerkleinert.

300 g verriebene Blütendroge wurden mit 3 l CHCl_3 p.a. im Soxhlet 10 Stdn. extrahiert (4 l-Kolben, Dampfbad, Extraktionshülse 30 cm x 5.5 cm). Nach Einengen des braunen Extrakts am Rotationsverdampfer verblieb eine braune sirupöse Masse. Diese wurde wiederholt mit je 100 ml Petroläther digeriert und heiß durch Faltenfilter filtriert. Die vereinigten Petrolätherextrakte gaben beim Abkühlen gelbe flockige Niederschläge, die abgesaugt wurden. Die braungrüne Mutterlauge zeigte Anreicherung von Chkrophyll, die Niederschläge Anreicherung von Phenolen. Durch Einengen der Mutterlauge konnten weitere Niederschläge gewonnen werden: Rohmelanervin.

Die Rückstände der Petrolätherauskochung und Filtration gaben nach Abdunsten des Petroläthers ein gelbes Pulver (9 g). Dieses wurde in Aceton gelöst und filtriert, wobei sich phenolische Inhaltsstoffe auflösten und schwerer lösliche Triterpensäuren zurückblieben.

Nach Abdampfen des Acetons wurde mit 60%igem Alkohol versetzt und im Scheidetrichter 5mal mit Petroläther ausgeschüttelt. Die vereinigten Petrolätherausschüttelungen ergaben nach Einengen kleinere Mengen Rohmelanervin. Beim Einengen der Alkohol-

phasen schieden sich leuchtend gelbe Niederschläge ab. Diese wurden in absolutem Alkohol in der Hitze gelöst. Nach einigen Tagen kristallisierten glänzende, hellgelbe Nadeln von Melanervin-Äthanolat aus, die in Rosetten angeordnet sind (Smp. 165 - 168).

Die Wasser-Alkohol-Lösung ergab nach einigen Tagen ebenfalls hellgelbe Niederschläge von Rohmelanervin.

Das vereinigte Rohmelanervin (1.5 g) wurde in 20 ml Aceton gelöst und auf eine Kieselgelsäule pipettiert. Elution mit 1 l Benzin-Äther-Aceton 5:5:1 (Säule 40 cm, 3 cm ϕ). Es wurden Fraktionen von anfangs 20, dann 50 ml aufgefangen. In den Fraktionen 2 - 5 war das Melanervin nachzuweisen, in den Fraktionen 5 - 8 Gemische von Strobopinin und Kryptostrobin. Andere phenolische Inhaltsstoffe oder Artefakte wurden nicht weiter untersucht.

Die Melanervinfraktionen wurden am Rotationsverdampfer eingengt und der schwach gelblich kristalline Rückstand aus 95%igem EtOH und CHCl_3 3:1 umkristallisiert. Es ergaben sich 450 mg schneeweißer Niederschlag, der aus glänzend farblosen Kristallen (Säulen, Spieße) vom Smp. 164° bestand (Äthanolat). Ein Teil des Melanervins wurde aus Benzol umkristallisiert, der feinkristalline weiße Niederschlag hatte den Smp. 148 - 150°. Kristallisation aus CHCl_3 und $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ 2:1 ergab trikline Tafeln und Polyeder vom Smp. 183°.

Nach Trocknen einer verrießenen Probe des Äthanolats im HV bei 120° und 10^{-5} Torr (15 Stdn.) erhielten wir Melanervin, das frei von Kristallsolvens war und einen Smp. bei 194° aufwies. Gesamtausbeute ca. 0.2%.

Melanervin

(2,4-Dihydroxy-6-methoxy)-tolyl-3-(5,7-dihydroxy-6-methyl)-flavanonyl-8-phenylmethan

$\text{C}_{31}\text{H}_{28}\text{O}_7$ (512.53) Ber. C: 72.64% H: 5.50%

Gef. C: 72.60% H: 5.27%

Smp. 194° (HV, 120°)

Melanervin-äthanolat:

$C_{31}H_{28}O_7 \cdot C_2H_5OH$ (558.60) Ber. C: 70.95% H: 6.14%
Gef. C: 70.70% H: 5.91%

Smp. 164° (EtOH-CHCl₃ 3:1)

MG: (osmometrisch) 518

OR: $[\alpha]_D^{23} = -4.8^{\circ}$ (c=0.807 in Pyridin)

DC: $R_f = 0.79$ (K, DCÄ-ÄA-EE 8:1:1)

$R_f = 0.35$ (K, Et₂O-Bzn-Actn 5:5:1)

$R_f = 0.33$ (P, MeOH)

UV: (MeOH p.a.) λ_{max} (log ϵ) = 298 (4.086), 337 (4.001) nm
(MeOH+NaOAc) 260 (sh), 337 nm
(MeOH+NaOMe) 257 (sh), 338 nm
(MeOH+AlCl₃) 319 nm

IR: (KBr) $\tilde{\nu} = 3420$ cm⁻¹ (OH), 1615 (C=O), 1435, 1115 (CO)
800, 763, 750, 725, 692 (Ar)

NMR: (¹H, DMSO-d₆ + CDCl₃, TMS int. 100°)
 $\delta = 1.93$ ppm(s, 3H); 1.96(s, 3H)CH₃-3", 6;
2.82-3.38(m, 2H)CH₂-3; 3.71(s, 3H)OCH₃; 5.45(dd, J=5.5 u.
10 Hz, 1H)H-2; 6.16(s, 1H)CH-9; 6.54(s, 1H)H-3";
7.08(s_{br}, 5H)Ph"; 7.28(s, 5H)Ph'; 9.92(br, 3H)OH-2", 6", 7;
12.70(s, 1H)OH-5;

NMR: (¹³C, DMSO-d₆, TMS int.)
 $\delta = 7.5$ ppm C-6a; 8.7 C-3"a; 34.2 C-8a; 40.5 C-3;
55.2 C-4"α; 82.0 C-2; 92.6 C-3", 5"; 102.2 C-10;
103.9 C-1"; 103.9 C-6; 106.2 C-8; 125.1 C-4"; 126.6 C-2', 6';
127.3 C-3", 5"; 128.3 C-2", 6"; 128.3 C-3', 4', 5';
138.7 C-1'; 142.6 C-1"; 153.8 C-2", 6"; 156.8 C-4";
158.0 C-9; 159.2 C-5; 162.9 C-7; 197.2 C-4;

MS: (EI 70 eV, 4 KV, 100 μA, 130°C; DE 100°C, 10⁻⁶ T)
m/e 512 M⁺ (4% rel.Int.) 491(1) 417(3) 389(2) 361(3)
360(20) 359(10) 358(8) 357(8) 330(6) 329(7) 283(6)
281(5) 271(22) 270(100) 269(47) 256(10) 255(9) 254(4)
253(10) 243(12) 242(19) 241(24) 227(15) 226(5) 193(51)
167(13) 166(59) 165(12) 154(45) 153(19) 139(16) 138(44)
137(15) 123(18) 110(13) 104(10) 103(11) 91(8) 77(13)
69(23) 55(13) 51(17) 43(15) 39(23) 31(34)

5.3 Isolierung von Strobopinin und Kryptostrobin

Die Fraktionen 5 - 8 (S. 187) wurden auf ca. 2 ml eingengt und durch präparative DC auf 0.5 mm Kieselgelschichten im Fließmittelsystem DCÄ-ÄÄ-EE aufgetrennt. Die abgeschabten Schichten beider Zonen (DC siehe S. 117) wurden mit Aceton eluiert und aus den Eluaten Strobopinin und Kryptostrobin auskristallisiert. Nach mehrmaligem Umkristallisieren aus 70%igem Alkohol und Trocknen im Exsiccator erhielten wir 60 mg Strobopinin in Form von farblosen Nadeln vom Smp. 226⁰ und 46 mg eines feinkristallinen Niederschlags von Kryptostrobin, Smp. 203 - 205⁰.

Strobopinin

(5,7-Dihydroxy-6-methyl-Flavanon)

$C_{16}H_{14}O_4$ (270.27) Ber. C: 71.10% H: 5.22%
Gef. C: 70.65% H 5.35%

Smp. 226⁰ (EtOH 70%ig)

DC: $R_f = 0.77$ (K, DCÄ-ÄÄ-EE 8:1:1)
 $R_f = 0.56$ (K, Et₂O-Bzn-Actn 5:5:1)
 $R_f = 0.53$ (P, MeOH)

UV: (MeOH) $\lambda_{max} = 292, 340$ (sh) nm
(MeOH+NaOAc) 255 (sh), 295 (sh), 330 nm
(MeOH+NaOMe) 223 (sh), 327 nm
(MeOH+AlCl₃) 316, 385 nm

IR: (KBr) $\tilde{\nu} = 3100$ cm⁻¹ (OH), 1635 (C=O), 1575 (Ar),
1105 (CO), 815, 760, 704 (Ar)

NMR: (¹H, CDCl₃, TMS int.)
 $\delta = 2.05$ ppm (s, 3H)CH₃-6; 2.8-3.4(m, 2H)CH₂-3;
5.42(dd, J=5 u. 12 Hz, 1H)H-2; 6.02(s, 1H)H-8);
7.40(s, 5H)Ph; 9.5(br, 1H)OH-7; 12.48(s, 1H)OH-5;
(¹³C, DMSO-d₆, TMS int.)
 $\delta = 7.0$ ppm C-6a; 42.2 C-3; 78.4 C-2; 94.5 C-8;
101.9 C-10; 102.1 C-6; 126.5 C-2', 6'; 128.5 C-3', 4', 5';
139.5 C-1'; 160.0 C-5; 161.7 C-9; 165.2 C-7; 196.4 C-4;

MS: EI 70 eV, 4 KV, 300 μ A, 200⁰C; DE 180⁰C $8 \cdot 10^{-7}$ T)
m/e 271(15% rel.Int.) 270 M⁺(100) 269(45) 193(61)
167(22) 166(85) 138(50) 104(20) 103(15) 68(18) 55(26)

Kryptostrobin

(5,7-Dihydroxy-8-methyl-flavanon)

$C_{16}H_{14}O_4$ (270.27) Ber. C: 71.10% H: 5.22%

Gef. C: 71.30% H: 5.45%

Smp: 203 - 205° (EtOH 70%ig)

DC: $R_f = 0.68$ (K, DCÄ-ÄÄ-EE 8:1:1)

$R_f = 0.51$ (K, Et₂O-Bzn-Actn 5:5:1)

$R_f = 0.60$ (P, MeOH)

UV: (MeOH) $\lambda_{max} = 290, 340$ nm

(MeOH+NaOAc) 255 (sh), 295 (sh), 332 nm

(MeOH+NaOMe) 223 (sh), 328 nm

(MeOH+AlCl₃) 316, 385 nm

IR: (KBr) $\tilde{\nu} = 3300$ cm⁻¹ (OH), 1620 (C=O), 1100, 1070 (CO), 818, 760, 693 (Ar)

NMR: (CDCl₃, TMS int.)

$\delta = 2.05$ ppm (s, 3H)CH₃-8; 2.8-3.4(m, 2H)CH₂-3;

5.50(dd, 5 u. 12 Hz, 1H)H-2; 6.02(s, 1H)H-6; 7.42(s, 5H)Ph;

9.0(br, 1H)OH-7; 12.03(s, 1H)OH-5

5.4 Dehydrierung von Melanervin mit Jod-Kaliumacetat (223)

In einem 100 ml Rundkolben wurden 3 g frisch geschmolzenes Kaliumacetat in 30 ml Eisessig unter Erwärmen gelöst. Hierzu wurden 100 mg Melanervin in Lösung gebracht. Ein Tropftrichter mit Schliff wurde aufgesetzt und innerhalb 30 min eine Lösung von 300 mg Jod p.a. in 20 ml Eisessig zum Kolbeninhalt getropft. Die braune Lösung wurde 2 Stdn. am Rückfluß gekocht. Nach dem Abkühlen wurde das Reaktionsgemisch in 150 ml Wasser gerührt. Dabei fiel ein hellbrauner Niederschlag aus. Weiterhin wurde festes Natriumsulfit bis zur Entfärbung des Überstandes eingerührt. Der voluminöse Niederschlag wurde abgutscht, mit Wasser säurefrei gewaschen und dann bis zur klaren Lösung in wenig Äthanol erhitzt. Nach dem Abkühlen kristallisierten gelbe Niederschläge aus. Wir erhielten zuletzt 60 mg eines Gemisches. Das Produkt wurde in ca. 1 ml Aceton gelöst, auf mehrere Kieselgelplatten bandförmig aufgetragen, im Laufmittel DCÄ-ÄÄ-EE entwickelt und nach Abtragen der

Schichten der Zonen I ($R_f = 0.61$), II ($R_f = 0.76$) und III ($R_f = 0.85$) mit Aceton eluiert. Zone I und II konnten aus 80%igem EtOH umkristallisiert werden.

Strobochrysin (Zone I)

Smp.: 298 - 300° (EtOH 80%ig)

UV: (MeOH) $\lambda_{\max} = 214, 248, 272, 318 \text{ nm}$

NMR: (DMSO- d_6 , TMS int.)

$\delta = 7.70\text{--}8.00 \text{ ppm}$ (m, 2H) H-2', 6'; 7.32-7.55 (m, 3H) H-3', 4', 5'; 6.79 (s, 1H) H-8; 6.47 (s, 1H) H-3; 2.02 (s, 3H) CH₃-6; 10.2 (br, 1H) OH-7; 13.1 (s, 1H) OH-5;

MS: (EI 70 eV, 4 kV, 100 μA , 190°C; DE 170°C, 10^{-6} T)
m/e 268 M⁺ (100% rel.Int.) 240(6) 239(12) 213(5)
193(4) 166(10) 165(5) 138(9) 137(5) 134(6) 123(5)
110(4) 105(4) 102(5) 77(5) 69(10) 55(6) 51(4)

Strobopinin (Zone II)

Smp.: 210 - 212° (EtOH 80%ig)

UV: (MeOH) $\lambda_{\max} = 293, 335 \text{ nm}$
(MeOH+NaOAc) 257 (sh), 330 nm
(MeOH+NaOMe) 222 (sh), 327 nm
(MeOH+AlCl₃) 314, 385 nm

IR: (KBr) $\bar{\nu} = 3080 \text{ cm}^{-1}$ (OH), 1635 (C=O) 1570 (Ar), 1107 (CO), 812, 760, 704 (Ar)

MS: (EI 70 eV, 4 kV, 100 μA , 190°C; DE 150°C, 10^{-6} T)
m/e 270 M⁺ (100% rel.Int.) 269(42) 193(58) 167(20)
166(91) 138(48) 104(15) 103(12) 69(18) 55(20)

Dehydromelanervin (Zone III)

UV: (MeOH) $\lambda_{\max} = 249, 275, 320 \text{ nm}$

MS: (EI 70 eV, 4 kV, 100 μA , 210°C; DE 180°C, $6 \cdot 10^{-7} \text{ T}$)
m/e 510 M⁺ (rel.Int. 3%) 492(6) 415(23) 368(12) 360(5)
268(100) 240(7) 239(11) 193(19) 166(29) 138(20)

5.5 Alkaliabbau von Melanervin

Mit 20 mg Melanervin wurden ein Alkaliabbau mittels 2N NaOH und mit 10 mg ein reduzierender Abbau mit Natriumamalgam im alkalischen Milieu - wie das unter V. 4.1 und V. 4.2 beschrieben ist - durchgeführt, mit der Ausnahme, daß mit 4mal 20 ml Äther ausgeschüttelt wurde. Die Abbauprodukte wurden dünn-schichtchromatographisch überprüft (S. 127) und in μg -Mengen aus den Platten gewonnen. Die Hauptkomponenten Methylphloroglucin und Methylphloroglucin- β -methyläther wurden durch präparative DC nach III. 2. isoliert. Hierzu mußten ca. 10 mg Abbaugemisch aufgetragen und, nachdem die Platten in DCA-ÄÄ-EE 8:1:1 entwickelt waren, mit Aceton eluiert werden.

Alle Verbindungen wurden durch GC mit authentischen Proben identifiziert und die Massenspektren angefertigt. Ferner wurde das Abbaugemisch nach V. 6.1 trimethylsilyliert und durch GC-MS untersucht.

GC-Bedingungen: Säule 2 m, 6x3 mm, 10% UCCW-982
(Abb.80,S.128) Helium-Durchfluß 50 ml/min
Temperaturprogramm 140 - 250°, 5°/min
Injektion 280°C
Papiervorschub 0.5 cm/min

MS-Bedingungen: Ionenquelle EI 70 eV, 4 KV, 100 μA , 150 - 200°C,
Direkteinlaß 150°, $5 \cdot 10^{-7}$ - $5 \cdot 10^{-6}$ T,
GC-Einlaß Sep.T. 200°C, 30 ml He/min

DC-Bedingungen und R_F -Werte siehe S. 127

Benzoessäure

MS: m/e 122 M^+ (95% rel.Int.) 105(100) 77(63) 51(21)

Benzoessäure-TMS-Ester:

Retentionszeit $t_r = 1.2$ min

MS: m/e 194 M^+ (rel.Int. 5%) 180(16) 179(100) 136(7)
135(73) 105(66) 77(30) 75(8) 73(7) 51(8) 40(15)

3-Phenylpropanol-1

MS: m/e 136 M^+ (rel.Int.28%) 118(72) 117(89) 92(61) 91(100)
69(32) 57(45)

Phenylpropanol-TMS-Äther:

Retentionszeit $t_r = 3.2$ min

MS: m/e 208 M^+ (rel.Int. 3%) 193(16) 175(5) 119(10) 118(100)
117(75) 103(6) 92(14) 91(39) 89(56) 75(26) 73(25) 65(9)
40(12)

Hydrozimtsäure

MS: m/e 150 M^+ (rel.Int. 48%) 133(5) 132(6) 131(12) 105(21)
104(63) 91(100) 78(14) 77(13) 65(10) 51(16)

Hydrozimtsäure-TMS-Ester:

Retentionszeit $t_R = 4.2$ min

MS: m/e 222 M^+ (rel.Int. 17%) 208(9) 207(50) 189(4) 132(6)
131(3) 105(12) 104(100) 103(4) 91(21) 77(7) 75(73) 73(35)

Zimtsäure

MS: m/e 148 M^+ (90% rel.Int.) 147(100) 131(26) 103(54)
102(27) 94(18) 91(30) 77(48) 51(36)

Zimtsäure-TMS-Ester:

Retentionszeit $t_R = 6.2$ min

MS: m/e 220 M^+ (rel.Int. 23%) 206(17) 205(100) 161(76)
145(24) 135(17) 131(88) 103(53) 102(11) 77(41) 75(46)
73(15)

Methylphloroglucin- β -monomethyläther (Phenol X)

(2,4-Dihydroxy-6-methoxytoluol)

Smp.: 113°

MS: m/e 154 M^+ (rel.Int. 100%) 153(34) 139(26) 125(15)
123(35) 69(29) 55(14)

IR: (KBr) $\bar{\nu} = 3340$ cm^{-1} (OH), 1610(Ar), 1100(CO)

NMR: ($\text{CDCl}_3 + \text{DMSO}-d_6$, TMS int.)
 $\delta = 1.91$ ppm (s, 3H) $\text{CH}_3\text{-Ar}$; 3.71 (s, 3H) OCH_3 ; 5.2-5.85
(br, 1H) OH; 5.92 (d, $J=2.5$ Hz, 1H) H-5; 6.05 (d, $J=2.5$ Hz, 1H)
H-3;

Methylphloroglucin- β -monomethyläther-PTMS-Äther:

Retentionszeit $t_R = 8.3$ min

MS: m/e 299 (rel.Int. 26%) 298 M^+ (100) 297(12) 284(10)
283(34) 269(5) 268(4) 251(15) 209(1) 147(2) 133(3)
119(2) 89(2) 75(4) 73(24) 45(6)

Phloroglucin

MS: m/e 127 (rel.Int. 6%) 126 M⁺(100) 111(5) 98(4) 97(7)
85(15) 80(10) 69(11) 55(5) 52(9)

Phloroglucin-PTMS-Äther:

Retentionszeit t_r = 8.6 min

MS: 343 (rel.Int. 1%) 342 M⁺(53) 328(19) 327(63) 268(3)
253(6) 147(20) 133(10) 75(7) 74(8) 73(100) 45(14)

Methylphloroglucin

Smp: 204 - 207⁰ (EtOH)

MS: m/e 140 M⁺ (rel.Int. 100%) 139(81) 123(15) 122(14)
111(10) 85(11) 69(28) 55(15)

IR: (KBr) $\bar{\nu}$ = 3420 cm⁻¹(OH); 1610(Ar); 1130, 1075(CO)

NMR: (DMSO-d₆) TMS int.

δ = 1.81 ppm (s,3H)CH₃-Ar; 5.80 (s,2H)ArH; 8.4-8.6
(br,3H)OH;

Methylphloroglucin-PTMS-Äther:

Retentionszeit t_r = 9.8 min

MS: m/e 357 (rel.Int. 33%) 356 M⁺(100) 341(25) 327(4)
283(6) 268(8) 253(18) 251(6) 147(6) 133(4) 75(3) 74(3)
(73(35) 45(4)

Methylphloracetophenon (s.S.195)

5.6 Aluminiumchlorid-Abbau von Melanervin

100 mg Melanervin wurden in 50 ml Benzol p.a. und 1 g Aluminiumchlorid wasserfr. 2 Stdn. unter Rückfluß und Feuchtigkeitsschluß am Magnetrührer erhitzt. Das Aluminiumchlorid ging langsam unter Orangefärbung des Gemisches in Lösung. Nach 2 Stdn. entstand eine dunkelgrüne Lösung, welche auf Raumtemperatur abgekühlt wurde. Verdünnen mit 80 ml 0.1 N HCl ergab eine hellrote benzolische Phase. Die saure Lösung wurde zuerst mit Benzol, dann mit Äthylacetat ausgeschüttelt, bis die wässrige Phase farblos war. Die roten organischen Phasen wurden am Rotationsverdampfer auf ca. 5 ml eingedunstet und auf eine 35 cm lange, (2.5 cm i.D.,) Kieselgelssäule gebracht. Mit Dichloräthan-Äthylacetat-Eisessig 8:1:1 wurde eluiert und 12 Fraktionen zu 50 ml aufzufangen (DC-Überprüfung siehe Seite 133).

Nach Einengen der Fraktionen 1 - 3 kristallisierte ein roter Farbstoff aus der Lösung.

Smp.: 273° (HOAc)

DC: $R_f = 0.93$ (K, DCÄ-ÄA-EE 8:1:1)

VIS: (Et₂O) $\lambda_{\max} = 515, 550 \text{ nm}$

IR: (KBr) $\bar{\nu} = 3020 \text{ cm}^{-1}(\text{CH}), 1450, 820, 780, 763, 745, 695, 660(\text{Ar})$

Nach Einengen der Fraktionen 4 - 6 verblieb ein kristalliner Rückstand.

Methylphloracetophenon

Smp.: 203°

DC: $R_f = 0.42$ (K, DCÄ-ÄA-EE 8:1:1)

UV: (MeOH $\lambda_{\max} = 210$ (sh), 225, 289, 335 nm

(MeOH+NaOAc) 298 (sh), 322 nm

(MeOH+NaOMe) 324, 385 (sh) nm

(MeOH+AlCl₃) 218, 242 (sh), 310, 382 nm

IR: (KBr) $\bar{\nu} = 3200 \text{ cm}^{-1}(\text{OH}), 1610(\text{C}=\text{O}), 1105(\text{CO}), 790(\text{Ar})$

NMR: (DMSO-d₆, TMS int.)

$\delta = 1.87 \text{ ppm}$ (s, 3H)CH₃-Ar; 2.58(s, 3H)CH₃-CO; 6.03(s, 1H)H-3; 10.32(s_{br}, 1H); 10.55(s, 1H)OH-2, 6; 13.96(s, 1H)OH-2

MS: (EI, 70 eV, 4 KV, 300 μA , 200°C, DE 170°, $8 \cdot 10^{-7} \text{ T}$)
m/e 182 M⁺ (44% rel.Int.) 167(100) 153(6) 83(30)

Methylphloracetophenon-PTMSÄ:

Retentionszeit $t_R = 12.6 \text{ min}$ (siehe S. 192)

MS: m/e 401 (3% rel.Int.) 400(15) 399(36) 398 M⁺(100)
383(4) 311(4) 295(3) 293(2) 221(2) 193(2) 147(5)
133(4) 75(6) 74(3) 73(40) 45(8)

Nach Einengen der Fraktionen 7 - 9 ließ sich ein kristalliner Rückstand gewinnen, welcher als Methylphloroglucin identifiziert wurde (siehe Seite 194).

5.7 Methylierung von Methylphloroglucin- β -monomethyläther

5 mg des isolierten Abbauproduktes 2,4-Dihydroxy-6-methoxy-toluol (siehe Seite 193) wurden in 1 ml DMF p.a. (wasserfrei) gelöst und mit 50 mg wasserfreiem Kaliumcarbonat p.a. versetzt. Nach Zugabe von 2 ml Methyljodid (frisch destilliert) wurde unter Lichtabschluß 5 Std. am Magnetrührer gerührt. Die Salze wurden sodann unter Nachwaschen mit Äther abfiltriert. Zuletzt wurde das Filtrat am Rotationsverdampfer bis auf 1 ml eingengt, mit 30 ml Chloroform p.a. aufgenommen und 3mal mit je 20 ml Wasser gewaschen. Nach Trocknen der organischen Phase mit Na_2SO_4 sicc. wurde am Rotationsverdampfer eingengt, bis ein öliger Rückstand verblieb.

2,4,6-Trimethoxytoluol

DC: $R_f = 0.63$ (K, Benzol-Aceton 9:1)

IR: (kapillar zwischen NaCl) $\bar{\nu} = 2840 \text{ cm}^{-1}$, 2940(CH), 1590(Ar), 1125(CO)

NMR: (CDCl_3 , TMS int.)
 $\delta = 2.0 \text{ ppm}$ (s, 3H) CH_3 -Ar; 3.75, 3.79(s, 9H) OCH_3 ;
6.11(s, 1H) ArH

MS: (EI 70, eV, 4 KV, 100 μA , 140°C; DE 50°C, 10^{-6} T)
m/e 183 (rel.Int. 8%) 182 M^+ (100) 181(22) 167(17)
153(20) 151(23) 139(12) 121(15) 91(6)

5.8 Methylierung von Methylphloracetophenon

20 mg des isolierten Abbauproduktes 2,4,6-Trihydroxy-3-methyl-acetophenon wurden wie unter 5.6 beschrieben methyliert, das halb feste Produktgemisch in Aceton gelöst, auf 3 Kieselgelplatten (0.5 mm Schichtdicke) aufgetragen und im Fließmittel Benzol-Aceton 9:1 entwickelt. Die Schichten der beiden Hauptzonen bei $R_f = 0.6$ und 0.67 wurden abgetragen, mit Chloroform eluiert und eingengt.

2,4,6-Trimethoxy-3-methyl-acetophenon

DC: $R_f = 0.60$ (Benzol-Aceton 9:1)

IR: (KBr) $\bar{\nu} = 2840 \text{ cm}^{-1}$, 2940 (CH), 1680(C=O), 1580(Ar)
1103, 1135(CO)

NMR: (CDCl₃, TMS int.)

δ = 2.05 ppm (s, 3H) CH₃-Ar; 2.49 (s, 3H) CH₃-CO;
3.70, 3.80, 3.83 (s, 9H) OCH₃; 6.23 (s, 1H) H-5;

MS: (EI 70 eV, 4 KV, 100 μ A, 180°C; DE 150°C 10⁻⁶ T)

m/e 224 M⁺ (88% rel.Int.) 209(100) 194(46) 136(21)
91(54)

2-Hydroxy-4,6-dimethoxy-5(bzw.-3)-methylacetophenon

DC: R_f = 0.68 (Benzol-Aceton 9:1)

Smp.: 156° (orange Nadeln) Mischkristallisat der beiden Isomeren

NMR: (CDCl₃, TMS int.)

δ = 2.00 ppm (s, 3H) CH₃Ar; 2.60 (s, 3H) CH₃CO;
3.70, 3.87 (s, 6H) OCH₃; 5.91 (s, 1H) H-5 bzw. H-3;
13.92 (s, 1H) OH-2

MS: (EI 70 eV, 4 KV, 100 μ A, 180°C, DE 100°C, 10⁻⁶ T)

m/e 210 M⁺ (rel.Int. 48%) 195(98) 167(100) 91(26)
77(18) 69(32) 55(22)

5.9 Acetylierung von Melanervin

a) 30 mg Melanervin wurden nach IV. 1 a) acetyliert. Erhalten wurden nach Umkristallisieren aus 90%ig. EtOH 22 mg.

Melanervin-tetraacetat

(2,4-Diacetoxy-6-methoxy)-tolyl-3-(5,7-diacetoxy-6-methyl)-flavanonyl-8-phenylmethan

C₃₉H₃₆O₁₁ (680.68) Ber. C: 68.81% H: 5.33%

Gef. C: 68.54% H: 5.17%

Smp.: 134° (farblose Nadeln aus EtOH)

DC: R_f = 0.66 (Toluol-ÄA 5:4)

UV: (MeOH) $\lambda_{\max}$ = 225 (sh), 263, 326 nm

IR: (KBr) $\bar{\nu}$ = 1750 cm⁻¹ (Ester C=O), 1675 (Flav. C=O),
1600 (Ar), 1180 (CO)

NMR: (CDCl₃) TMS int.

δ = 1.65 ppm (s, 3H), 1.81 (s), 1.83 (s), 1.88 (s) 12H
OAc+ArCH₃; 2.42 (s) 3H; OAc-5; 2.16-3.05 (m 2H) CH₂-3;

3.78 (s, 3H)OCH₃; 5.25(dd, J=5 u. 12 Hz, 1H)H-2;
5.91(s, 1H)CH-9; 6.32(s, 1H)ArH; 6.9-7.45(m, 10H)Ph;

MS: (EI 70 eV, 4 KV, 100 µA, 180°, DE 160°, 10⁻⁶ T)
m/e 680 M⁺ (rel. Int. 10%) 639(11) 638(34) 637(50)
620(5) 597(13) 596(48) 595(100) 580(5) 579(13)
578(5) 577(17) 576(47) 554(14) 553(35) 538(4)
537(13) 536(6) 535(22) 534(58) 512(4) 511(8)
495(5) 494(6) 493(21) 492(39) 459(5) 450(6) 433(8)
417(5) 407(6) 391(8) 390(7) 389(25) 363(8) 361(5)
359(6) 357(6) 313(10) 309(6) 285(12) 284(21) 283(13)
281(4) 255(13) 253(8) 243(20) 242(23) 241(34)
227(7) 225(8) 167(5) 166(5) 154(12) 153(8) 139(9)
131(25) 105(4) 104(13) 103(12) 91(8) 83(13) 78(10)
77(8) 69(5) 55(5) 44(14) 43(79) 42(22)

b) 50 mg Melanervin wurden in 1 ml Ac₂O aufgeschlämmt und nach IV. 1 b) acetyliert. Nach Trocknen in der Trockenpistole bei 100° erhielten wir 54 mg Acetatgemisch, welches in 1 ml Aceton gelöst, auf 4 Kieselgelplatten von 0.5 mm Schichtdicke bandförmig aufgetragen wurde. Entwicklung in Toluol-Äthylacetat 5:4. Nach Eluieren mit CHCl₃ erhielten wir 31 mg Triacetat und 11 mg Tetraacetat.

Melanervin-7,2",6"-triacetat

(2,4-Diacetoxy-6-methoxy)-tolyl-3-(5-hydroxy-7-acetoxy-6-methyl)-flavanonyl-8-phenylmethan)

C ₃₇ H ₃₄ O ₁₀	638.64	Ber. C:	69.58%	H: 5.37%
		Gef. C:	69.08%	H: 5.35%

Smp.: 128° (farblose Splitter aus EtOH-CHCl₃ 1:1)

DC: R_f = 0.79 (Toluol-ÄA 5:4)

UV: (MeOH) λ_{max} = 237 (sh), 279, 355 nm
(MeOH+NaOAc) 280, 348 nm
(MeOH+NaOMe) 285, 335 nm
(MeOH+AlCl₃) 280, 310, 350, 410 nm

IR: (KBr) ν̄ = 2900 cm⁻¹ (OH+CH), 1750 (Ester C=O)
1630 (Flav. C=O), 1166 (CO), 694 (Ar)

NMR: (CDCl_3 ; TMS int.)
 δ = 1.61(s, 3H)OAc; 1.82(s) 1.86(s) 1.91(s) 12H,
 OAc+ArCH₃; 2.55-3.35(m, 2H)CH₂-3; 3.78(s, 3H)OCH₃;
 5.25(dd, J=5.5 u. 11 Hz, 1H)H-2; 5.87(s, 1H)CH-9;
 6.30(s, 1H)ArH; 7.0-7.45(m, 10H)Ph; 12.21(s, 1H)OH-5)

MS: (EI 70 eV, 4 KV, 100 μ A, 200^o, DE 140^o, 10⁻⁶ T)
 m/e 638 M⁺ (rel.Int. 13%) 597(17) 596(50) 595(100)
 579(21) 554(15) 553(33) 536(16) 511(11) 493(25)
 492(46) 389(26) 285(15) 284(21) 283(17) 243(20)
 242(23) 241(47) 131(25) 103(12) 83(16) 43(79)

5.10 Methylierung von Melanervin mit Dimethylsulfat

100 mg Melanervin wurden in 15 ml Aceton p.a. wasserfrei gelöst und 1 g wasserfr. Kaliumcarbonat p.a. zugegeben. Nach Zutropfen von 0.5 ml Dimethylsulfat wurde der 100 ml Rundkolben am Heizpilz und Magnetrührer unter Rückfluß erhitzt. Aus der gelben Lösung bildete sich eine rotbraune Suspension. Nach 40 min lebhaften Rührens wurde die Suspension fast farblos und nach Abkühlen von den Salzen filtriert. Die gelbe Lösung wurde am Rotationsverdampfer zu einem orangen Öl eingengt und dann mit 70%igem Methanol aufgenommen, wobei am Dampfbad bis zur Lösung erhitzt wurde. Nach dem Abkühlen entstand ein weiß-gelber Niederschlag. Die chromatographische Überprüfung ergab 2 Hauptkomponenten, welche durch präparative DC im System Et₂O-Bzn-Aceton. 5:5:1 getrennt und durch Auskratzen der Schichten isoliert wurden. Zone I bei R_F = 0.56 ergab nach Eluieren mit Chloroform 15 mg.

Melanervinchalkon-pentamethyläther

2,4,6-Trimethoxytolyl-3-(2',4',6'-trimethoxy-3'methyl)-chalkonyl-5'-phenylmethan

C ₃₆ H ₃₈ O ₇	582.66	Ber. C:	74.20%	H:	6.57%
		Gef. C:	73.69%	H:	6.61%

Smp: 70 - 75^o (glasig amorph)

DC: R_F = 0.56 (K, Äther-Benzin-Aceton 5:5:1)

UV: (MeOH) λ_{max} = 285, 321, 372 (sh) nm

IR: (KBr) $\bar{\nu}$ = 2930, 2820 (cm⁻¹(CH)), 1640(C=O),
 1580 cm⁻¹(Ar), 1100(CO), 690(Ar)

NMR: (CDCl₃, TMS int.)
 δ = 2.10 ppm (s, 3H); 2.19 (s, 3H)CH₃Ar; 3.12, 3.16,
 3.22, 3.50, 3.71, 3.81 (s, 18H)OCH₃; 6.82, 6.31 (s, 2H)
 CH-9, Ar-H; 6.95 (d, J=16 Hz, 1H)CH- α ; 7.0-7.5 (m)Ph, 7.41
 (d, J=16 Hz, 1H)CH- β 11H;
 MS: (EI 70 eV, 4 KV, 100 μ A, 200°C, DE 180°, 10⁻⁶ T)
 m/e 582 M⁺ (rel.Int. 67% 583(25) 568(20) 567(54)
 552(19) 551(37) 537(9) 536(37) 535(100) 519(13)
 459(20) 445(6) 431(12) 401(5) 387(10) 341(4) 327(5)
 309(8) 297(8) 295(8) 283(14) 271(17) 270(35) 269(12)
 255(15) 239(40) 227(15) 216(12) 195(37) 193(42)
 182(16) 179(20) 177(8) 165(41) 135(12) 131(41)
 117(21) 115(12) 105(20) 103(46) 92(8) 91(66) 77(21)
 44(87)

5.11 Alkaliabbau von Melanervinchalkon-pentamethyläther

Mit 5 mg Melanervinchalkon-pentamethyläther wurden nach
 V. 4.3 ein Alkaliabbau durchgeführt, wobei 2 Stdn. unter
 Rückfluß erhitzt wurde. Nach Ausschütteln der salzsauren
 Lösung mit Diäthyläther p.a. verblieb nach Abdampfen der
 Ätherphasen ein sirupöser Rückstand, welcher dünnschichtchro-
 matographisch untersucht wurde. Schließlich wurde das Gemisch
 durch GC-MS getrennt und soweit möglich mit authentischen
 Proben verglichen.

GC-Bedingungen: Säule 2 m, 6x3 mm, 10% UCCW-982

Abb. 97, S.145) Helium Durchfluß 65 ml/min

Temperaturprogramm 150 - 250°, 5°/min

Injektion 290°

Papiervorschub 0.5 cm/min

MS-Bedingungen: Ionenquelle EI 70 eV, 4 KV, 300 μ A, 150-200°C

GC-Einlaß 200°, Separator 200°

2,4,6-Trimethoxytoluol

Retentionszeit t_R = 6.1 min

MS: m/e 182 M⁺ (100% rel.Int.) 181(22) 167(17) 153(20)
 151(23) 139(12) 121(15) 91(6)

DC: R_F = 0.88 (K, Et₂O-Bzn-Actn 5:5:1)

Benzoessäure

Retentionszeit $t_R = 8.5$ min

MS: m/e 122 M^+ (95% rel.Int.) 105(100) 77(68) 51(30)

DC: $R_f = 0.53$ (K, Et₂O-Bzn-Actn 5:5:1)

Zimtsäure

Retentionszeit $t_R = 14.0$ min

MS: m/e 148 M^+ (% rel.Int.) 147(100) 131(30) 103(55)
102(25) 94(18) 91(45)

DC: $R_f = 0.34$ (K, Et₂O-Bzn-Actn 5:5:1)

2,4,6-Trimethoxy-3-methyl-phenyl-phenylmethan

Retentionszeit $t_R = 18.4$ min

MS: m/e 273 (17% rel.Int.) 272 M^+ (86) 257(10) 243(9)
241(8) 227(12) 225(6) 195(25) 181(22) 167(10) 165(8)
119(10) 109(75) 108(100) 91(94) 79(23) 67(42) 55(20)

DC: $R_f = 0.70$ (K, Et₂O-Bzn-Actn 5:5:1)

Bis(2,4,6-trimethoxy-3-methylphenyl)-phenylmethan

Retentionszeit $t_R = 51$ min

MS: m/e 452 M^+ (rel.Int. 28%) 437(11) 423(15) 421(14)
375(6) 361(18) 345(6) 315(12) 298(9) 284(20) 270(38)
255(20) 241(15) 239(14) 227(31) 207(14) 195(17)
193(10) 182(21) 180(20) 168(28) 167(25) 165(18) 151(13)
119(17) 109(100) 108(95) 95(40) 91(52) 69(53) 55(65)

DC: $R_f = 0.60$ (K, Et₂O-Bzn-Actn 5:5:1)

2,4,6-Trimethoxy-5-methyl-3-(2,4,6-trimethoxy-tolyl-3)-benzyliden-acetophenon

Retentionszeit $t_R = 58$ min

MS: (EI 70 eV, 4 KV, 100 μ A, DE 200⁰, $5 \cdot 10^{-6}$ T)
m/e 494 M^+ (rel.Int. 88%) 479(100) 447(76) 371(18)
355(29) 298(30) 297(70) 270(59) 195(35) 193(47)
165(32) 147(23) 91(41) 73(42)

DC: $R_f = 0.77$ (K, Et₂O-Bzn-Actn 5:5:1)

5.12 Silylierung von Melanervin

20 mg Melanervin wurden nach IV. 5. trimethylsilyliert, wir erhielten ca. 20 mg eines harzigen Rückstandes von Melanervin-tetra-trimethylsilyläther

NMR: (CCl_4 , TMS int.)

δ = 0.31-0.16 ppm (s, 36H) CH_3Si ; 2.03 (s, 6H) CH_3Ar ;
2.40-3.05 (m, 2H) CH_2 -3; 3.68 (s, 3H) OCH_3 ; 5.20 (dd, $J=4.5$
u. 12 Hz, 1H) H-2; 5.70 (s, 1H) CH-9; 6.05 (s, 1H) H-3";
6.98 (s, 5H) Ph^m ; 7.21 (m, 5H) Ph ;

MS: (EI 70 eV, 4 KV, 300 μA , 180°C, DE 150°, 10⁻⁶ T)
m/e 800 M^+ (31% rel.Int.) 785(100) 727(30) 713(8)
697(5) 696(6) 682(5) 681(7) 652(3) 651(4) 610(3)
487(33) 430(27) 416(10) 386(65) 326(5) 315(28)
309(13) 298(29) 147(5) 104(4) 75(8) 73(6)

5.13 Deuterierung von Melanervin

Die Lösung von 20 mg Melanervin in 0.4 ml Hexadeuterodimethylsulfid wurde mit 0.1 ml Deuterotrifluoressigsäure geschüttelt und mit 0.5 ml Deuteriochloroform verdünnt. Nach 3tägigem Stehen unter Verschluss kristallisierte ein Niederschlag aus der Lösung, welcher abfiltriert wurde.

Melanervin-d₅

MS: (EI 70 eV, 4 KV, 100 μA , 120°C, DE 80°, 5 · 10⁻⁷ T)
m/e 516 (2% rel.Int.) 515(4) 514(8) 513(10) 510(4)
495(2) 419(2) 418(3) 417(2) 361(19) 360(24) 359(13)
330(25) 329(20) 272(50) 271(100) 270(97) 269(30)
256(11) 255(8) 244(34) 243(62) 242(81) 241(40)
194(44) 193(43) 167(77) 166(78) 155(52) 154(48) 139(35)
138(36) 104(32) 103(29) 91(26) 88(39) 69(35)

5.14 Isomerisierung von Melanervin

5 mg Melanervin wurden mit 2 ml 2%iger alkoholischer Natronlauge versetzt und die Lösung 1/2 Stde. unter Rückfluß gekocht. Aus der orangegelb gefärbten Lösung wurde das Äthanol am Rotationsverdampfer größtenteils abgedampft und anschließend mit 20%iger Salzsäure vorsichtig angesäuert. Nach Zugabe von 10 ml Äther wurde die wässrige Phase 2mal ausgeschüttelt,

(2,4-Dihydroxy-6-methoxy)-tolyl-3-(5,7-dihydroxy-6-methyl)-
flavanonyl-6-phenylmethan)

Smp.: 235 - 237° (EtOH-CHCl₃ 1:1)

UV:	(MeOH)	$\lambda_{\max}$	= 299, 338 nm
	(MeOH+NaOAc)		257 (sh), 340 nm
	(MeOH+NaOMe)		257 (sh), 329 nm
	(MeOH+AlCl ₃)		319, 400 nm (sh)

NMR: (^1H , DMSO- d_6 +CDCl $_3$, TMS int. 35 $^\circ$)
 δ = 2.02 ppm (s, 6H)CH $_3$ -6, 3"; 2.82-3.38 (m, 2H)CH $_2$ -3;
 3.73 (s, 3H)OCH $_3$; 5.47 (dd, J=5 u. 10Hz, 1H)H-2;
 6.12 (s, 1H)CH-9; 6.35 (s, 1H)H-3", 7.15 (s, 5H)Ph";
 7.41 (s, 5H)Ph; 8.3-10.0 (br, 3H)OH-2", 6", 7; 13.66 (s, 1H)
 OH-5

a) 20 mg Isomelanervin wurden nach IV. 1. a) mit Pyridin/ Ac_2O acetyliert. Erhalten wurden nach Umkristallisieren aus EtOH-CHCl_3 3:1 15 mg

(2,4-Diacetoxy-6-methoxy)-tolyl-3-(5-hydroxy-7-acetoxy-8-methyl)-flavanonyl-6-phenylmethan

$C_{37}H_{34}O_{10}$	638.64	Ber. C:	69.58%	H:	5.37%
		Gef. C:	69.65	H:	5.22%

Smp. 133 - 134⁰ (farblose Plättchen aus Äthanol-Chloroform 3:1)

DC: $R_f = 0.77$ (KG, Toluol-ÄA 5:4)

UV: (MeOH) $\lambda_{\max} = 279 \text{ nm}$, 355
 (MeOH+NaOMe) = 255 (sh), 330 nm
 (MeOH+NaOAc) 278, 344 nm
 (MeOH+AlCl₃) 279, 355 nm

IR: (KBr) $\bar{\nu} = 2930 \text{ cm}^{-1}$ (CH, 2500-3100(OH), 1750(Ester C=O)
 1625(Flav.C=O), 1177, 1115(CO), 694(Ar)

NMR: (CDCl₃, TMS int.)
 $\delta = 1.70 \text{ ppm}$ (s), 1.73(s)3H)OAc; 1.90, 1.95 (s,12H)
 OAc+CH₃-Ar; 2.70-3.50(m,2H)CH₂-3; 3.80(s,3H)OCH₃;
 5.50(dd,J=5 u. 12 Hz,1H)H-2; 6.09(s,1H)CH-9;6.52(s,
 1H)ArH-5"; 7.18(m,5H)Ph"; 7.48(s,5H)Ph'; 12.3(s,1H)
 OH-5

MS: (EI 70eV, 4 KV, 300 μ A, 210⁰C; DE 190⁰; 10⁻⁶ T)
 m/e 638 M⁺ (rel.Int. 25%) 597(15) 596(46) 595(54)
 579(11) 553(21) 535(24) 501(27) 493(24) 459(27)
 417(13) 389(35) 359(15) 357(12) 313(26) 295(12)
 285(24) 284(91) 283(22) 255(19) 253(12) 243(37)
 242(60) 241(100) 225(13) 154(30) 139(16) 131(51)
 103(27) 91(13) 83(43) 77(16) 69(59) 43(100)

b) 40 mg Isomelanervin wurden wie unter 5.8 b) mit Natriumacetat zur Reaktion gebracht, jedoch 15 Stdn. unter Rückfluß gekocht. Die Trennung der 2 Acetylierungsprodukte geschah mit Hilfe der DC wie bei Melanervin-triacetat. Es wurden 16 mg partiell acetyliertes und 18 mg vollacetyliertes Produkt erhalten.

Isomelanervin-tetraacetat

(2,4-Diacetoxy-6-methoxy)-tolyl-3-(5,7-diacetoxy-8-methyl)-flavanonyl-6-phenylmethan

C₃₉H₃₆O₁₁ 680.68 Ber. C: 68.81; H: 5.33%
 Gef. C: 68.53 H: 5.12%

Smp. 147⁰ (farblose Splitter aus Äthanol-Chloroform 3:1)
 DC: $R_f = 0.70$ (Toluol-ÄA 5:4)

UV: (MeOH) λ = 225 (sh), 265, 330 nm

IR: (KBr) $\bar{\nu}$ = 2930 cm^{-1} (CH), 1750(Ester C=O), 1680(Flav. C=O), 1590(Ar), 1165(CO), 695, 750(Ar)

NMR: (CDCl_3 , TMS int.)
 δ = 1.95 ppm, 1.97(s, 18H)OAc+CH₃-Ar; 2.55-3.40 (m, 2H)CH₂-2; 3.82(s, 3H)OCH₃; 5.50(dd, J= 5 u. 12 Hz, 1H)H-2; 5.95(s, 1H)CH-9; 6.53(s, 1H)ArH-5"; 7.20(s, 5H)Ph"; 7.48(s, 5H)Ph'

MS: (EI 70 eV, 4 KV, 300 μA , 210°C, DE 190°, 10⁻⁶ T)
m/e 680 M⁺ (rel.Int. 4%) 639(25) 638(67) 637(37)
597(23) 596(66) 595(79) 579(12) 578(14) 577(21)
554(17) 553(31) 531(18) 536(27) 535(56) 519(17)
501(29) 493(44) 477(15) 459(27) 431(12) 417(16)
390(15) 389(54) 359(17) 357(15) 313(28) 285(31)
284(56) 283(28) 255(23) 253(17) 243(37) 242(58)
241(100) 227(13) 225(14) 154(31) 139(19) 131(54)
103(23) 91(14) 83(44) 43(100)

5.16 Silylierung von Isomelanervin

20 mg Isomelanervin wurden wie unter IV. 5. beschrieben trimethylsilyliert. Das harzartige Produkt wurde an der Rotationspumpe getrocknet.

Isomelanervin-2", 6", 7-tris-trimethylsilyläther

NMR: (CCl_4 , TMS int.)
 δ = -0.08-0.15 ppm(s, 27H)CH₃-Si;
1.98(s, 3H)CH₃-Ar; 2.05(s, 3H)CH₃-Ar; 2.55-3.30(m, 2H)CH₂-3; 3.72(s, 3H)OCH₃; 5.40(dd, J=4.5 u. 11.5 Hz, 1 H)H-2; 5.83(s, 1H)CH-9; 5.90(s, 1H)H-3"; 7.04(s_{br}, 5H)Ph"; 7.38(s, 5H)Ph; 12.03(s, 1H)OH-5

5.17 Acetylierung von Strobopinin

10 mg Strobopinin (Smp. 228-230°) wurden in 0.5 ml Pyridin p.a. (wasserfr.) gelöst und 0.5 ml Acetanhydrid p.a. zugegeben. Bei Raumtemperatur und unter gelegentlichem Umschütteln ließen wir 1 Stde. reagieren, worauf das Gemisch auf 10 ml Eiswasser gegossen wurde. Aus dem gelblichen Sirup kristallisierten nach längerem Stehen weiße Niederschläge, welche abgesaugt und mit Wasser gewaschen wurden. Nach

Umkristallisieren aus 95%igem Äthanol erhielten wir farblose Kristalle (Spieße und Blättchen) vom Smp. 139 - 142°. Die Substanz erwies sich nach NMR- und IR-Untersuchungen als Strobopinin-7-mono-acetat.

Die Mutterlauge wurde eingeeengt, der getrocknete Rückstand in Pyridin gelöst und mit 1 ml Acetanhydrid versetzt. Nach kurzem Aufkochen am Dampfbad wurde die Mischung über Nacht stehen gelassen und dann auf Eiswasser gegossen. Der abgesetzte, flockige weiße Niederschlag wurde abgesaugt, gewaschen und getrocknet. Nach Umkristallisieren aus Äthanol-Chloroform erhielten wir lange Nadeln vom Smp. 167°, die sich als Strobopinin-5,7-diacetat erwiesen.

Strobopinin-diacetat

Smp. 167° (farblose Nadeln aus Äthanol-Chloroform 3:1)

DC: $R_f = 0.79$ (K, Toluol-ÄA 5:4)

UV: (MeOH) $\lambda_{\max} = 258, 321 \text{ nm}$

IR: (KBr) $\bar{\nu} = 3000 \text{ cm}^{-1}(\text{CH})$, 1750(Ester-C=O), 1675(C=O Flav.), 1600(Ar), 1177, 1120, 1075(CO), 703, 768(Ar)

NMR: (CDCl₃, TMS int.)
 $\delta = 2.00 \text{ ppm}$ (s, 3H)CH₃-6; 2.34(s, 3H)OAc-7; 2.43 (s, 3H)OAc-5; 2.62-3.40(m, 2H)CH₂-3; 5.51(dd, J= 4.5 u. 12 Hz, 1H)H-2; 6.82(s, 1H)H-8; 7.48(s, 5H)Ph

MS: (EI 70 eV, 4 KV, 100 μA , 180°C, DE 150°, 10⁻⁶ T)
m/e 354 M⁺ (rel. Int. 4%) 312(97) 271(19) 270(98) 269(40) 252(12) 235(6) 208(10) 193(57) 166(100) 138(33) 137(30) 104(37) 103(23) 91(16) 78(18) 77(22) 69(18) 55(15) 43(100)

Strobopinin-7-monoacetat

Smp. 140° (farblose Plättchen aus Äthanol)

DC: $R_f = 0.60$ (K, Toluol-ÄA 5:4)

IR: (KBr) $\bar{\nu} = 2500\text{-}3150 \text{ cm}^{-1}(\text{OH})$, 2910(CH), 1750(Ester-CO), 1635(Flav.CO), 775, 694(Ar)

NMR: (CDCl_3 , TMS int.)
 δ = 2.01 ppm(s,3H) CH_3 -Ar); 2.33(s,3H)OAc-7; 2.7-3.5
(m,2H) CH_2 -3; 5.49(dd,J=5 u. 12 Hz, 1H)H-2; 6.32(s,
1H)H-8; 7.49(s,5H)Ph; 12.30(s,1H)OH-5;

5.18 Acetylierung von Kryptostrobin

10 mg Kryptostrobin (Smp. 202-206°) wurden in 0.5 ml Pyridin p.a.(wasserfr.) gelöst und mit 0.5 ml Acetanhydrid p.a. 15 Stdn. durch Stehen bei Raumtemperatur acetyliert. Durch Gießen der Lösung in Eiswasser erhält man einen erst ölligen, dann amorphen gelblichen Niederschlag, der abfiltriert und noch einmal 15 Stdn. acetyliert wird. Zuletzt erhält man einen weißen amorphen Niederschlag, der in Alkohol gelöst wird. Nach längerem Stehen der Lösung scheiden sich kristalline Massen ab, die aus Äthanol-Chloroform umkristallisiert werden und einen Smp. von 162° ergeben.

Kryptostrobin-diacetat

Smp. 162° (EtOH- CHCl_3 1:1)

DC: R_f = 0.81 (K,Toluol-ÄÄ 5:4)

UV: (MeOH) λ_{max} = 260, 319 nm

NMR: (CDCl_3 , TMS int.)
 δ = 2.09 ppm(s,3H) CH_3 -8; 2.35(s,3H)OAc-7; 2.40(s,3H)
OAc-5; 2.60-3.35(m,2H) CH_2 -3; 5.52(dd,J=5 u. 11.5 Hz,
1H)H-2; 6.57(s,1H)H-6; 7.49(s,5H)Ph

MS: (EI 70 eV, 4 KV, 100 μA , 200°C, DE 180°, 10⁻⁶ T)
m/e 354 M⁺ (rel.Int. 3%) 313(21) 312(98) 271(19)
270(89) 269(37) 252(7) 235(5) 227(4) 208(9) 193(57)
167(15) 166(100) 138(47) 137(23) 131(6) 104(33)
103(17) 91(8) 78(16) 77(17) 69(17) 43(>100)

5.19 Synthese von Bis-(2,4,6-trimethoxyphenyl)-phenylmethan

3 g 1,3,5-Trimethoxybenzol und 1 g Benzaldehyd wurden in ein Becherglas eingewogen und unter Rühren nach und nach 5 ml 32%iger Salzsäure zugegeben. Der weiße Niederschlag wurde 2mal mit 5 ml Wasser versetzt und abdekantiert, wobei die Substanz fest wurde. Die kristalline Substanz

wurde abgenutscht und säurefrei gewaschen. Nach Trocknung im Exsiccator erhielten wir 3.35 g Rohprodukt in 89%iger Ausbeute. Umkristallisieren aus absolutem Alkohol ergab 3.15 g farblose Kristalle (Blättchen) vom Smp. 190°.

Bis-(2,4,5-trimethoxy)-phenyl-phenylmethan wurde aus 1,2,4-Trimethoxybenzol auf gleiche Weise dargestellt. Es wurden farblose Kristalle vom Smp. 127° in 85%iger Ausbeute erhalten.

Bis-(2,4,6-trimethoxyphenyl)-phenylmethan

Smp. 190° (EtOH)

DC: $R_f = 0.55$ (Et₂O-Bzn-Actn 5:5:1)

GC: Ret. Zeit $t_r = 44$ min GC-Bedingungen siehe S. 200

UV: (MeOH) $\lambda_{max} = 244$ (sh), 265, 273 nm

IR: (KBr) $\bar{\nu} = 3000$ cm⁻¹, 2940, 2850(CH), 1580(Ar), 1115(CO), 695, 810(Ar)

NMR: (¹H, CDCl₃, TMS Int.)
 $\delta = 3.50$ ppm(s,12H)OCH₃-2,2',6,6'; 3.78(s,6H)OCH₃-4,4'; 6.11(s,4H)H-3,3',5,5'; 6.23(s,1H)CH; 7.09(s,5H)Ph;

NMR: (¹³C, CDCl₃, TMS Int.)
 $\delta = 37.0$ ppm C-8a; 54.9 C-4"a; 91.7 C-3",5"; 114.0 C-1"; 123.6 C-4"; 126.5 C-3",5"; 127.3 C-2",6"; 145.1 C-1"; 158.6 C-4"; 159.2 C-2",6";

MS: EI 70 eV, 4 KV, 100 μ A, 180°C, DE 120°, 8 · 10⁻⁷ T)
 m/e 425 (rel.Int. 20%) 424 M⁺(72) 409(7) 393(18) 247(15) 331(10) 301(6) 257(29) 256(100) 255(28) 241(17) 228(21) 227(16) 226(11) 225(23) 212(13) 196(12) 181(41) 180(16) 179(94) 168(10) 165(13) 151(19) 121(17) 91(42) 78(6) 77(5) 69(6)

5.20 Syntheseversuch von Bis-(2,4,6-trimethoxy-3-methyl-phenyl)-phenylmethan

3 g 2,4,6-Trimethoxytoluol und 1 g Benzaldehyd wurden in einem 100 ml Kolben mit 3 g ZnCl₂ wasserfr. p.a. versetzt

und unter Rühren am Magnetprüher 3 Std. unter Rückfluß gekocht. Das Reaktionsprodukt, ein braunes Öl, erwies sich als ein Gemisch von mehr als 6 Substanzen. Es wurde unter den gleichen Bedingungen wie beim Alkaliabbau S. 200 beschrieben, durch GC-MS untersucht.

2,4,6-Trimethoxyltoluol

Retentionszeit t_R = 6.3 min (siehe S. 200)

2,4,6-Trimethoxy-3-methyl-phenyl-phenylmethan

Retentionszeit t_R = 18.8 min (siehe S. 201)

Bis-(2,4,6-trimethoxy-3-methyl-phenyl)-methan

Retentionszeit t_R = 28.4 min

MS: (EI 70 eV, 4 KV, 100 μ A, DE 200⁰, $5 \cdot 10^{-6}$ T)
m/e 377 (24% rel.Int.) 376 M⁺(100) 361(17) 346(15)
345(71) 329(12) 315(9) 299(10) 195(75) 194(79)
193(25) 182(18) 181(54) 179(29) 165(92) 151(20)
150(17) 135(16)

Bis-(2,4,6-trimethoxy-3-methyl-phenyl)-phenylmethan

Retentionszeit t_R = 52 min (siehe S. 201)

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- 1) R.I. REED, J.M. WILSON, J.chem.Soc. 5949 (1963)
- 2) C.S. BARNES, J.L. OCCOLOWITZ, Austral.J.Chem. 17, 975 (1964)
- 3) H. AUDIER, Bull.Soc.chim.France 2892 (1966)
- 4) A. PELTER, P. STAINTON, M. BARBER, J.heterocycl.Chem. 2, 262 (1965)
- 5) A. PELTER, P. STAINTON, A.P. JOHNSON, M. BARBER, J.heterocycl.Chem. 2, 256 (1965)
- 6) J.H. BOWIE, D.W. CAMERON, Austral.J.Chem. 19, 1627 (1966)
- 7) D.G.I. KINGSTON, Tetrahedron 27, 2691 (1971)
- 8) A.G. VALESÍ, E. RODRIGUEZ, G. VANDER-VELDE, T.J. MABRY, Phytochem. 11, 2821 (1972)
- 9) R.V.M. CAMPBELL, S.H. HARPER, A.D. KEMP, J.chem.Soc. 1787 (1969)
- 10) T.J. MABRY, K.R. MARKHAM, in The Flavonoids edit. by J.B. HARBORNE, T.J. MABRY, H. MABRY, London (1975)
- 11) S.E. DREWES, Chroman and Related Compounds (Progress in Mass Spectrometry Vol. 2), Weinheim (1974)
- 12) A. PROX, Tetrahedron 24, 3697 (1968)
- 13) J. CHOPIN, M.L. BOUILLANT, C.R. Acad.Sci.Paris 270 C, 331 (1970)
- 14) M.L. BOUILLANT, J. CHOPIN, C.R. Acad.Sci.Paris 273 C, 1759 (1971)
- 15) H. WAGNER, L. ROSPRIM, P. DÜLL, Z.Naturforsch. 27b, 954 (1972)
- 16) H.R. SCHULTEN, D.E. GAMES, Biomed.Mass.Spectrom. 2, 120 (1974)
- 17) K. WEINGES, W. BÄHR, P. KLOSS, Arzneimittelforsch. 18, 537 (1968)
- 18) E.D. PELLIZZARI, Ch.-M. CHUANG, J. KUC, E.B. WILLIAMS, J.Chromatogr. 40, 285 (1969)
- 19) R.D. SCHMID, Tetrahedron 28, 3259 (1972)
- 20) R.D. SCHMID, P. VARENNE, R. PARIS, Tetrahedron 28, 5037 (1972)
- 21) R.D. SCHMID, J.B. HARBORNE, Phytochem. 12, 2269 (1973)
- 22) J.NUNEZ-ALARCON, E. RODRIGUEZ, R.D. SCHMID, T.J. MABRY, Phytochem. 12, 1451 (1973)
- 23) H. WAGNER, O. SELIGMANN, Tetrahedron 29, 3029 (1973)
- 24) O. SELIGMANN, H. WAGNER, in Topics in Flavonoid Chemistry and Biochemistry edit. by L. FARKAS, M. GABOR, F. KALLAY, Budapest (1975)
- 25) G. AURNHAMMER, Dissertation München (1968)
- 26) T. PURDIE, J. IRVINE, J.Chem.Soc. 83, 1021 (1903)
- 27) R. KUHN, H. TRISCHMANN, J. LÖW, Angew.Chem. 67, 32 (1955)
- 28) R. KUHN, H. EGGE, R. BROSSMER, A. GAUKE, P. KLESSE, W. LOCHINGER, R. BÖHM, H. TRISCHMANN, D. TSCHAMPEL, Angew.Chem. 72, 805 (1960)
- 29) K. WALLENFELS, G. BECHTLER, R. KUHN, H. TRISCHMANN, H. EGGE, Angew.Chem. 75, 1014 (1963)
- 30) S. HAKOMORI, J.Biochem. (Japan) 55, 205 (1964)
- 31) E. COREY, M. CHAYKOVSKY, J.Am.Chem.Soc. 84, 866 (1962)
- 32) J.S. BRIMACOMBE, B.D. JONES, M. STACEY, J.J. WILLARD, Carbohydr.Res. 2, 167 (1966)
- 33) N. KORNBLUM, R. SELTZER, P. HABERFIELD, J.Am.Chem.Soc. 85, 1148 (1963)
- 34) M.L. BOUILLANT, J. FAVRE-BOUVIN, M.J. CHOPIN, C.R. Acad.Sci. 279, D 295 (1974)
- 35) M.L. BOUILLANT, J. FAVRE-BOUVIN, J. CHOPIN, Phytochem. 14, 2267 (1975)

- 36) N.K. KOCHETKOV, N.S. WULFSON, O.S. CHIZHOV, B.M. ZOLOTAREV, *Tetrahedron* 19, 2209 (1963)
- 37) N.K. KOCHETKOV, O.S. CHIZHOV, *Adv.Carbohydr.Chem.* 21, 39 (1966)
- 38) K. HEYNS, H. SCHARMANN, *Ann.Chem.* 667, 183 (1963)
- 39) K. HEYNS, D. MÜLLER, *Tetrahedron* 21, 55 (1965)
- 40) K. HEYNS, D. MÜLLER, H. SCHARMANN, *Tetrahedron* 21, 507 (1965)
- 41) J.B. HARBORNE, *Phytochem.* 4, 107 (1965)
- 42) C.W. GLENNIE, J.B. HARBORNE, *Phytochem.* 10, 1325 (1971)
- 43) H. WAGNER, M.A. IYENGAR, O. SELIGMANN, L. HÜRHAMMER, W. HERZ, *Phytochem.* 11, 2350 (1972)
- 44) V. KOVACIK, S. BAUER, J. ROSIK, P.KOVAC, *Carbohydr.Res.* 5, 282 (1968)
- 45) R.M. THAMPSON, N. GERBER, R.A. SEIBERT, D.M. DESIDERIO, *Drug Metabolism a. Disposition* 1, (2) 489 (1973)
- 46) O.S. CHIZHOV, N.F. MADUDINA, *Izv.Akad.Nauk.SSSR, Ser.Khim.* 284 (1967)
- 47) J.B. HARBORNE, C.A. WILLIAMS, in *The Flavonoids* S. 376, edit. by J.B. HARBORNE, T.J. MABRY, H. MABRY, London (1975)
- 48) G. SPITELLER, *Massenspektrometrische Strukturanalyse organischer Verbindungen*, S. 201, Weinheim (1966)
- 49) *Carbohydr.Chem. Vol. 6, Specialist Periodical Reports* S. 172 edit. by J.S. BRIMACOMBE, London (1973)
- 50) O.S. CHIZHOV, L.A. POLJAKOVA, N.K. KOCHETKOV, *Dokl.Acad.Nauk.SSSR*, 685 (1964)
- 51) T.R. SESHADRI, S. VYDEESWARAN, *Phytochem.* 11, 803 (1972)
- 52) V.M. CHARI and H. WAGNER, in *Topics in Flavonoid Chemistry and Biochemistry* edit. by L. FARKAS, M. GABOR, F. KALLAY, Budapest (1975)
- 53) H. WAGNER, M. ERTAN, O. SELIGMANN, *Phytochem.* 13, 857 (1974)
- 54) H.WAGNER, M.A. IYENGAR, O. SELIGMANN, J.L. BEAL, L. MITSCHER, *Lloydia* 36, (2) 166 (1973)
- 55) E. RODRIGUEZ, M. CHIN SEN, T.J. MABRY, X.A. DOMINGUEZ, *Phytochem.* 12, 2069 (1973)
- 56) J.B. HARBORNE, *Phytochem.* 4, 107 (1965)
- 57) J.B. HARBORNE, *Phytochem.* 3, 151 (1964)
- 58) L. FARKAS, B. VERMES, M. NOGRADI, *Chem.Ber.* 107, 1518 (1974)
- 59) Y. ITAGAKI, T. KUROKAWA, S. SASAKI, C.T. CHANG, F.C. CHEN, *Bull.Chem.Soc. (Japan)* 39, 538 (1966)
- 60) C. VAN DE SANDE, J.W. SERUM, M. VANDEWALLE, *Org.Mass.Spectrom* 6, 1333 (1972)
- 61) J.W. CLARK-LEWIS, *Austral.J.Chem.* 21, 3025 (1968)
- 62) M.L. DHAR, T.R. SESHADRI, *Tetrahedron* 7, 77 (1959)
- 63) J.B.H. MURRAY, C.Y. THENG, *J.chem.Soc.* 1491 (1960)
- 64) M. SHAMMA, L.D. STIVER, *Tetrahedron* 25, 3887 (1969)
- 65) M. CHARI, H. WAGNER, P.W. THIES, *Phytochem. im Druck*
- 66) H. FUJIWARA, G. NONAKA, A. YAGI, I. NISHIOKA, *Chem.Pharm.Bull.* 24 (3), 407 (1976)
- 67) W.A. BONNER, *J.Org.Chem.* 24, 1388 (1959)
- 68) H.O. BONVENG, *Acta Chem.Scand.* 15, 78, 96 (1961)
- 69) D.C. DE JONGH, K. BIEMANN, *J.Am.chem.Soc.* 85, 2289 (1963)
- 70) K. BIEMANN, D.C. DE JONGH, H.K. SCHNOES, *J.Am.chem.Soc.* 85, 1763 (1963)
- 71) N.K. KOCHETKOV, O. CHIZHOV, in *Methods in Carbohydr.Chemistry Vol. VI*, S. 540, edit. by R.L. WHISTLER, J.N.BEMILLER, New York and London (1972)

- 72) K. HEYNS, D. MÜLLER, *Tetrahedron* 21, 3160 (1965)
- 73) D.C. DE JONGH, *J.Org.Chem.* 30, 453 (1965)
- 74) K. HEYNS, D. MÜLLER, *Tetrahedr.Letters* 6061 (1966)
- 75) Y.S. OVODOV, E.V. EVTUSHENKO, *Carbohydr.Res.* 27, 169 (1973)
- 76) A.C. RICHARDSON, *Carbohydr.Res.* 4, 415 (1967)
- 77) H. WAGNER, H. DANNINGER, M.A. IYENGAR, O. SELIGMANN, L. FARKAS, S.S. SUBRAMANIAN, A.G.R. NAIR, *Chem.Ber.* 104, 2681 (1971)
- 78) Z.F. AHMED, H. RIMPLER, A.M. RIZK, F.M. HAMMOUDA, S.J. ISMAIL, *Phytochem.* 9, 1595 (1970)
- 79) K.R. MARKHAM, L.J. PORTER, *Phytochem.* 12, 2007 (1973)
- 80) W.W. BINKLEY, R.C. DOUGHERTY, D. HORTON, J.D. WANDER, *Carbohydr.Res.* 17, 127 (1971)
- 81) J. KARLINER, *Tetrahedr.Letters* 3545 (1968)
- 82) G.S. JOHNSON, W.S. RULIFFSON, R.G. COOKS, *Chem.Comm.* 587 (1970)
- 83) O.S. CHIZHOV, N.K. KOCHETKOV, N.N. MALYSHEVA, A.I. SHIYONOK, V.L. CHASHCHIN, *Org.Mass Spectrom.* 5, 1145, 1157 (1971)
- 84) N.K. KOCHETKOV, O.S. CHIZHOV, N.N. MALYSHEVA, A.I. SHIYONOK, *Org.Mass Spectrom.* 5, 481 (1971)
- 85) I.A. PEARL, S.F. DARLING, *Phytochem.* 7, 821, 825, 831, 837 (1968)
- 86) I.A. PEARL, S.F. DARLING, *Phytochem.* 9, 853, 857 (1970)
- 87) W.A. KÖNIG, H. BAUER, W. VOELTER, E. BAYER, *Chem.Ber.* 106, 1905 (1973)
- 88) D.C. DE JONGH, T. RADFORD, J.D. HRIBAR, S. HANNESIAN, M. BIEBER, G. DAWSON, C.C. SWEETLEY, *J.Am.chem.Soc.* 91, 1728 (1969)
- 89) K. VAN DE CASTEELE, H. DE POOTER, C.F. VAN SUMERE, *J.Chromatogr.* 121, 49 (1976)
- 90) J. VINK, J.H.W. BRUINS SLOT, J.J. DE RIDDER, J.P. KAMERLING, J.F.G. Vliegenthart, *J.Am.chem.Soc.* 94, 2542 (1972)
- 91) S.C. HAVLICEK, M.R. BRENNAN, P.J. SCHEUER, *Org.Mass Spectrom.* 5, 1273 (1971)
- 92) J.A. McCLOSKEY, R.N. STILLWELL, A.M. LAWSON, *Anal.Chem.* 40, 233 (1968)
- 93) K.W. GLOMBITZA, H. STOFFELEN, U. MURAWSKI, J. BIELACZEK, H. EGGE, *Planta med.* 25, 105 (1974)
- 94) H. STOFFELEN, K.W. GLOMBITZA, U. MURAWSKI, J. BIELACZEK, H. EGGE, *Planta med.* 22, 396 (1972)
- 95) J. DIEKMAN, J.B. THOMSON, C. DJERASSI, *J.Org.Chem.* 32, 3904 (1967)
- 96) H. SCHELS, H.D. ZINSMEISTER, K. PFLEGER, *Phytochem. im Druck*
- 97) H. SCHELS, K. PFLEGER, *Biochem.Mass Spektrom. im Druck*
- 98) E. NILSSON, *Ark. Kemi* 30, 393 (1968)
- 99) E. NILSSON, *Chemica Scripta Sweden* 4, 49 (1973)
- 100) E. BOMBARDELLI, A. BONATI, B. GABETTA, E.M. MARTINELLI, G. MUSTICH, B. DANIELLI, *J.Chromatogr.* 120, 115 (1976)
- 101) E. BOMBARDELLI, A. BONATI, B. GABETTA, E.M. MARTINELLI, G. MUSTICH, *J.Chromatogr. im Druck*
- 102) C.S. BARNES, J.L. OCCOLOWITZ, *Austral.J.Chem.* 17, 975 (1964)
- 103) N.S. WULFSON, V.J. ZARETSKII, V.G. ZYAKOON, *Ber.Akad.Wiss. USSR* 155, 1104 (1964), *Chem.Abstr.* 61, 1737 (1964)
- 104) R.H. SHAPIRO, C. DJERASSI, *J.Org.Chem.* 30, 955 (1965)
- 105) J.P. KUTNEY, G.E. EIGENDORF, T. INABA, D.L. DREYER, *Org.Mass Spectrom.* 5, 249 (1971)

- 106) M.A.W. EATON, D.W. HUTCHINSON, *Tetrahedr.Letters* 1337 (1971)
- 107) R.A.W. JOHNSTONE, B.J. MILLARD, F.M. DEAN, A.W. HILL, *J.chem.Soc. C* 1712 (1966)
- 108) G.B. GUISE, E. RITCHIE, R.G. SENIOR, W.C. TAYLOR, *Austral. J.Chem.* 20, 2429 (1967)
- 109) K.J. v.d.MERWE, P.S. STEYN, S.H. EGGERS, *Tetrahedr.Letters* 3923 (1964)
- 110) S. BLADT, *Dissertation München* (1975)
- 111) B. JACKSON, H.D. LOCKSLEY, F. SCHEINMANN, *J.chem.Soc.* 785 und 2500 (1967)
- 112) B. JACKSON, H.D. LOCKSLEY, F. SCHEINMANN, *Tetrahedron* 24, 3059 (1968)
- 113) B. JACKSON, H.D. LOCKSLEY, I. MOORE, F. SCHEINMANN, *J.chem. Soc. C* 2579 (1968)
- 114) J. SANTESSON, *Ark.Kemi* 30, 479 (1969); 31, 57 (1969)
- 115) P. ARENDS, P. HELBOE, J. MØLLER, *Org.Mass Spectrom.* 7, 667 (1973)
- 116) J.H. BEYNON, A.E. WILLIAMS, *Appl.Spectroscopy* 14, 156 (1960)
- 117) K.C. JOSHI, R.K. BANSAL, P. SINGH, *Z.Naturforsch.* 29c, 296 (1974)
- 118) G. DEMUTH, H. HINZ, O. SELIGMANN, H. WAGNER, *J.Medicin.Plant Res. im Druck*
- 119) H. WAGNER, G. DEMUTH, *Z.Naturforsch.* 29c, 204 (1974)
- 120) K. BIEMANN, H.K. SCHNOES, J.A. McCLOSKEY, *Chem.and Ind.* 448 (1963)
- 121) R. TSCHESCHE, A. HARZ, J. PETRICIC, *Chem.Ber.* 107, 53 (1974)
- 122) R. TSCHESCHE, K.H. HERMANN, R. LANGLAIS, B. TJIONG TJOA, G. WOLF, *Chem.Ber.* 106, 3010 (1973)
- 123) Y. TSUKITANI, J. SHOJI, *Chem.Pharm.Bull.* 21, 1564 (1973)
- 124) N. KONDO, J. SHOJI, O. TANAKA, *Chem.Pharm.Bull.* 21, 2702 (1973)
- 125) J.P.S. SARIN, H.S. GARG, N.M. KHANNA, M.M. DHAR, *Phytochem.* 12, 2461 (1973)
- 126) H. WAGNER, G. SCHWARTING, *Phytochem.* 16, 715 (1977)
- 127) H. WAGNER, P. KAZMAIER, *Phytochem.* 16, 711 (1977)
- 128) H. OKABE, N. KOSHITO, K. TANAKA, T. KAWASAKI, *Chem.Pharm.Bull.* 19, 2314 (1971)
- 129) L. FARKAS, B. VERMES, M. NOGRADI, A. KALMAN, *Phytochem.* 15, 215 (1976)
- 130) J. KÄRKKÄINEN, *Carbohydr.Res.* 14, 27 (1970)
- 131) K. HEYNS, H.F. GRÜTZMACHER, H. SCHARMANN, D. MÜLLER, *Fortschr.chem.Forsch.* 5, 448 (1966)
- 132) C.C. SWEELEY, R. BENTLEY, M. MAKITA, W.W. WELLS, *J.Am.Chem. Soc.* 85, 2497 (1963)
- 133) K. TESARIK, S. GLYCZY, V.S. PANSARE, *Chromatographia* 4, 396 (1971)
- 134) H.G.J. DeWILT, *J.Chromatogr.* 63, 379 (1971)
- 135) M.L. McGROGOR, R. REID, G.R. WALLER, E.C. NELSON, *Spectroscopy Letters* 7, 45 (1974)
- 136) J.G. SCHILLER, A.M. BOWSER, D.S. FEINGOLD, *Carbohydr.Res.* 25, 403 (1972)
- 137) S. BILLETTS, P.S. LIETMANN, C.FENSELAN, *J.Medicin.Chem.* 16, 30 (1973)
- 138) Y. IDA, T. KOMORI, T. KAWASAKI, K. YOSHIDA, K. KATO, *J.Pharm.Soc.(Japan)* 91, 119 (1971)

- 139) O.S. CHIZHOV, B.A. DMITRIEV, B.M. ZOLOTAREV, A.Y. CHERNYAK, N.K. KOCHETKOV, *Org.Mass Spectrom.* 2, 947 (1969)
- 140) H. BJÖRNDAL, B. LINDBERG, A. PILOTTI, S. SVENSSON, *Carbohydr.Res.* 15, 339 (1970)
- 141) H. BJÖRNDAL, C.G. HELLERQVIST, B. LINDBERG, S. SVENSSON, *Angew.Chem.* 16, 643 (1970)
- 142) H. BJÖRNDAL, B. LINDBERG, S. SVENSSON, *Carbohydr.Res.* 5, 433 (1967)
- 143) K. AXBERG, H. BJÖRNDAL, A. PILOTTI, S. SVENSSON, *Acta Chem. Scand.* 26, 1319 (1972)
- 144) H.B. BÖREN, P.J. GAREGG, B. LINDBERG, S. SVENSSON, *Acta Chem.Scand.* 25, 3299 (1971)
- 145) R.S. LAINE, C.C. SWEeley, *Anal.Biochem.* 43, 533 (1971)
- 146) R.A. LAINE, C.C. SWEeley, *Carbohydr.Res.* 27, 199 (1973)
- 147) D.C. De JONGH, K.BIEMANN, *J.Am.Chem.Soc.* 86, 67 (1964)
- 148) S. MORGENLIE, *Carbohydr.Res.* 41, 285 (1975)
- 149) S. KARADY, S.H. PINES, *Tetrahedron* 26, 4527 (1970)
- 150) B.A. DMITRIEV, L.V. BACKINOWSKY, O.S. CHIZHOV, B.M. ZOLOTAREV, N.K. KOCHETKOV, *Carbohydr.Res.* 19, 432 (1971)
- 151) F. EISENBERG, Jr., *Carbohydr.Res.* 19, 135 (1971)
- 152) D.C. De JONGH, *J.Org.Chem.* 30, 1563 (1965)
- 153) D.C. De JONGH, S. HANESSIAN, *J.Am.Chem.Soc.* 80, 3114 (1966)
- 154) O.S. CHIZHOV, N.N. MALYSHEVA, N.K. KOCHETKOV, *Carbohydr.Res.* 28, 21 (1973)
- 155) N.K.KOCHETKOV, O.S. CHIZHOV, *Biochim.Biophys.Acta* 83, 134 (1964)
- 156) N.K. KOCHETKOV, O.S. CHIZHOV, *Tetrahedron* 21, 2029 (1965)
- 157) J. STANEK, M. CERNY, J. KOCOUREK, J. PACAK, *The Monosaccharides* S. 257 und S. 265, New York und London (1963)
- 158) J.C. IRVINE, A.M. MOODIE, *J.Chem.Soc.* 93, 103 (1908)
- 159) H. PRINGSHEIM, A. STEINGROEVER, *Berichte* 59, 1001 (1926)
- 160) G.P. ELLIS, J. HONEYMAN, *J.Chem.Soc.* 2053 (1952)
- 161) D.J. BELL, G.D. GREVILLE, *J.Chem.Soc.* 1902 (1950)
- 162) S. PEAT, E. SCHLÜCHTERER, M. STACEY, *J.Chem.Soc.* 581 (1939)
- 163) A.A. MAGNIN, A.M. STEPHEN, *Tetrahedron* 26, 4019 (1970)
- 164) A.N. De BELDER, B. NORRMAN, *Carbohydr.Res.* 8, 1 (1968)
- 165) F.M.DEAN, *Naturally Occurring Oxygen Ring Compounds*, S. 382, London (1963)
- 166) R. MÜNSTER, *Dissertation München* (1966)
- 167) A.PELTER, R.HÄNSEL, *Chem. Ber.* 108, 790 (1975)
- 168) K. VENKATARAMAN, in *Chemistry of the Flavonoid Compounds* S. 70, edit. by T.S. GEISSMAN, Oxford (1962)
- 169) A.C. JAIN, T.R. SESHADRI, *Phytochem.* 3, 381 (1964)
- 170) T. SASAKI, M. MIKAMI, *Yakugaku Zasshi* 83, 897 (1963)
- 171) R. HÄNSEL, M. RIMPLER, R. SCHWARZ, *Tetrahedr. Letters* 735(1967)
- 172) K. VENKATARAMAN, in *Chemistry of Flavonoid Compounds* S. 84, edit. by T.S. GEISSMAN, Oxford (1962)
- 173) J.N. USMANI, N.U. KHAN, W. RAHAMAN, *J. Indian Chem. Soc.* 47, 179 (1970)
- 174) G.H. DRAFFAN, R.N. STILLWELL, J.A. McCLOSKEY, *Org.Mass Spectrom.* 1, 669 (1968)
- 175) R.M. TEETER, *10. Annual Conference on Mass Spectrometry of the Am.Soc. Abstracts* S. 51, New Orleans (1962)
- 176) P.S. SARIN, T.R. SESHADRI, *Tetrahedron* 8, 64 (1960)
- 177) W. MEIER, A. FÜRST, *Helv.chim.Acta* 45, 232 (1962)

- 178) L. RAMACHANDRA ROW, R.R. RAJU, J.sci.ind.Res.India 21B, 196 (1962)
- 179) W. BAKER, R. NODZU, R. ROBINSON, J.Chem.Soc. 74 (1929)
- 180) A.E. BIRD, A. MARSHALL, J.Chem.Soc. (C), 2418 (1969)
- 181) S.M. KUPCHAN, C.W. SIGEL, J.R. KNOX, M.S. UDAYAMURTHY, J.Org.Chem. 34, 1460 (1969)
- 182) R. BRAZ FILHO, O.R. GOTTLIEB, Phytochem. 10, 2433 (1971)
- 183) J. HORMAN, R. VIANI, Org.Mass Spectrom. 5, 203 (1971)
- 184) W.D. OLLIS, in The Chemistry of Flavonoid Compounds S. 353, Oxford (1962)
- 185) F.M. DEAN, Naturally Occurring Oxygen Ring Compounds S. 366, London (1963)
- 186) A.M. HURST, J.R. HARBORNE, Phytochem. 6, 1111 (1967)
- 187) K. VANDE CASTEELE, H. DE POOTER, C.F. VAN SUMERE, J.Chromatogr. 121, 49 (1976)
- 188) A. ARCOLEO, M. RUCCIA, S. CUSMANO, Ann.Chem. 51, 751 (1961)
- 189) J. DE PASCUAL TERESA, C. PORTELA MARCOS, I. SANCHEZ BELLIDO, An.Quim.Spain 64, 623 (1968)
- 190) S.E. FLORES, J. HERRAN, Rev.Brasil Quim. 54, 813 (1962)
- 191) R.D. HARTLEY, J.Chromatogr. 54, 335 (1971)
- 192) R. WETTSTEIN, Handbuch der Systematischen Botanik, S. 793, Leipzig u. Wien (1935)
- 193) J.F. MORTON, Econ.Botany 20, 31 (1966)
- 194) A. ANGLER, Syllabus der Pflanzenfamilien S. 350, Berlin (1964)
- 195) E.A. MENNINGER, Flowering trees of the world for tropics and warm climates, New York (1962)
- 196) E.A. MENNINGER, Seaside plants of the world, New York (1964)
- 197) A.R. PENFOLD, The volatile Oils of the Australian Flora Tasmania (1948)
- 198) R.D. GIBBS, Chemotaxonomy of Flowering Plants, Montreal u. London (1974)
- 199) E. GILDEMEISTER, F. HOFFMANN, Die Ätherischen Öle, Band VI, S. 304, Berlin (1961)
- 200) E. GUENTHER, The Essential Oils Vol. IV, S. 526 Princetown, New York (1950)
- 201) R. HEGNAUER, Chemotaxonomie der Pflanzen, Band V, S. 165, Basel u. Stuttgart (1962)
- 202) W. KARRER, Konstitution und Vorkommen der organischen Pflanzenstoffe, Basel u. Stuttgart (1958)
- 203) R.C. BOWYER, P.R. JEFFERIES, Austral.J.Chem. 15, 145 (1962)
- 204) R.O. HELLYER, J.T. PINHEY, J.Chem.Soc. 1496 (1966) C
- 205) A.J. BIRCH, P. ELLIOT, Austral.J.Chem. 7, 169 (1954)
- 206) J.B. LOWRY, Nature 241, 61 (1973)
- 207) J.A. LAMBERTON, Austral.J.Chem. 17, 692 (1964)
- 208) W.E. HILLIS, K. ISOI, Phytochem. 4, 541, 905 (1965)
- 209) A.J. BIRCH, P. ELLIOT, A.R. PENFOLD, Austral.J.Chem. 7, 169 (1954)
- 210) A.J. BIRCH, D.G. PETTIT, A.J. RYAN, R.N. SPEAKE, J.Chem.Soc. 2063 (1960)
- 211) S. FUJISE, T. NISHI, Chem.Ber. 66, 929 (1933)
- 212) V.H. POWELL, M.D. SUTHERLAND, Austral.J.Chem. 16, 282 (1963)
- 213) W.E. HILLIS, K. ISOI, Phytochem. 5, 541 (1966)
- 214) W.E. HILLIS, A. CARLE, Austral.J.Chem. 16, 147 (1963)
- 215) E.C. BATE-SMITH, The Phenolic Constituents of Plants and their Taxonomic Significance, J.Linn.Soc.London 58, 95-173 (1962)

- 216) J.R. AUSTEE, H.R. ARTHUR, A.L. BECKERHITE, D.K. DOUGALL, P.R. JEFFERIES, M. MICHAEL, J.Chem.Soc. 4065 (1952)
- 217) H.R. ARTHUR, A.R.H. COLE, K.J.L. THIEBERG, D.E. WHITE, Chem.Industr. 926 (1956)
- 218) C.S. CHOPRA, A.R.H. COLE, K.J.L. THIEBERG, D.E. WHITE, H.R. ARTHUR, Tetrahedr. Letters 1847 (1963)
- 219) H. WAI-HAAN, L. MAN-MOON, Phytochem. 15, 563 (1976)
- 220) J. CHOPIN, C.R. hebdom. Seances Acad.Sci. 245, 2300 (1957)
- 221) Sh. MATSUURA, Pharm.Bull. 5, 195 (1957)
- 222) H.S. MAHAL, K. VENKATARAMAN, J.Chem.Soc. 569 (1936)
- 223) N. LORETTE, T. GAGE, S. WENDER, J.Org.Chem. 16, 930 (1951)
- 224) N.R. BANNERJEE, T.R. SESHADRI, Proc.Indian Acad.Sci. 36 A, 134 (1952)
- 225) V.B. MAHESH, T.R. SESHADRI, J.Sci.Ind.Res. 14 B 608 (1955)
- 226) J. CHOPIN, M. JUSTIN, C.R. hebdom. Seances Acad.Sci. 248, 3307 (1959)
- 227) T.J. MABRY, K.R. MARKHAM, M.B. THOMAS, The systematic Identification of Flavonoids Berlin, Heidelberg, New York (1970)
- 228) R.M. HOROWITZ, L. JURD, J.Org.Chem. 26, 2446 (1961)
- 229) S. MAHEY, S.K. MUKERJEE, T.R. SESHADRI, Indian J.Chem. 8, 1052 (1970)
- 230) J. HERZIG, F. WENZEL, Monatshefte f.Chemie 23, 81 u. 112 (1902)
- 231) F.H. CURD, A. ROBERTSON, J.Chem.Soc. 1173 (1933)
- 232) A. McGOOKIN, A. ROBERTSON, T.H. SIMPSON, J.Chem.Soc. 2021(1951)
- 233) J.S. WAUGH, R.W. FESSENDEN, J.Am.Chem.Soc. 79, 846 (1957)
- 234) A. PELTER, R. WARREN, J.N. USMANI, R.H. RIZVI, M.ILYAS, W. RAHMAN, Experientia 25, 351 (1969)
- 235) H.L. HERGERT, E.F. KURTH, J.Am.Chem.Soc. 75, 1622 (1953)
- 236) A. PELTER, P.J. AMENECHI, J.Chem.Soc. 887 (1969)
- 237) M. OKIGAWA, N. KAWANO, W. RAHMAN, M.M. DHAR, Tetrahedr.Letters 40, 4125 (1972)
- 238) A. PELTER, R. WARREN, K.K. CHEXAL, B.K. HANDA, W. RAHMAN, Tetrahedron 27, 1625 (1971)
- 239) H. ERDTMAN, Svensk kem.Tidskr. 50, 68, 71 (1938)
- 240) M. SHIMOKORIYAMA, in The Chemistry of Flavonoid Compounds S. 286, edit. by T.A. GEISSMAN, Oxford (1962)
- 241) S. MEYERSON, H. DREWS, E.K. FIELDS, J.Amer.Chem.Soc. 86, 4964 (1964)
- 242) A.J. BIRCH, C.J. DAHL, A. PELTER, Tetrahedr.Letters 6, 481 (1967)
- 243) B.L. SHAW, T.H. SIMPSON, J.Chem.Soc. 655 (1955)
- 244) H. ERDTMAN, in Perspectives in Organic Chemistry S. 430, edit. by A.R. TODD, New York (1956)
- 245) J.W. CLARK-LEWIS, Rev.pure appl.Chem. 12, 96 (1962)
- 246) W. GAFFIELD, A.C. WAISS jr., Chem.Comm. 29 (1968)
- 247) T.H. SIDDAL, W.E. STEWART, J.Org.Chem. 34, 233 (1969)
- 248) A. MANNSCHRECK, L. ERNST, Tetrahedr.Letters 5939 (1968)
- 249) K. WEINGES, W. KALTENHÄUSER, H.D. MARX, E. NADER, F. NADER, J. PERNER, D. SEILER, Ann.Chem. 711, 184 (1968)
- 250) K. WEINGES, H.D. MARX, K. GORITZ, Chem.Ber. 103, 2336 (1970)
- 251) S.E. DREWES, D.G. ROUX, S.H. EGGERS, J. FEENEY, Chem.Comm. 368 (1966)
- 252) S.E. DREWES, D.G. ROUX, S.H. EGGERS, J. FEENEY, J.Chem.Soc.(C) 1217 (1967)

- 253) H. WAGNER, V.M. CHARI, J. SONNENBICHLER, *Tetrahedr.Letters* 21, 1799 (1976)
- 254) K.R. MARKHAM, B. TERMAI, *Tetrahedron* 32, 2607 (1976)
- 255) J.B. STOTHERS, *Carbon-13 NMR-Spectroscopy*, New York (1972)
- 256) G. LEVY, G.L. NELSON, *Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance for Organic Chemists*, New York (1972)
- 257) P. GUPTA, J.R. LEWIS, *J.Chem.Soc. (C)* 629 (1971)
- 258) J. EBEL, K. HAHLBROCK, H. GRISEBACH, *Biochim.Biophys.Acta* 269, 313 (1972)
- 259) W.E. HILLIS, Y. YAZAKI, *Phytochem.* 10, 1051 (1971)
- 260) W.E. HILLIS, N. ISHIKURA, *Phytochem.* 5, 1079 (1969)
- 261) K. WEINGES, W. BAHR, W. EBERT, K. GÖRTZ, H.D. MARX, *Fortschr.Chem.Org.Naturstoffe* 27, 158 (1969)
- 262) E. HASLAM, *Chemistry of Vegetable Tannins*, S. 69, London, New York (1966)
- 263) A.J. BIRCH, F.W. DONOVAN, *Austral.J.Chem.* 6, 360 (1953)
- 264) H. GRISEBACH, L. PATSCHKE, *Z.Naturforsch.* 17b, 557 (1962)
- 265) E. SPÄTH, F. WESSELY, *Monatshefte f.Chemie* 49, 229 (1925)
- 266) R. BOEHM, *Ann.Chem.* 329, 269, 286 (1903)
- 267) M. LOUNASMA, C.J. WIDEN, A. HUHTIKANGAS, *Phytochem.* 12, 2017 (1973)
- 268) A. MCGOOKIN, A. ROBERTSON, E. TITENSOR, *J.Chem.Soc.* 1579 (1939)
- 269) B. JACKSON, H.D. LOCKSLEY, F. SCHEINMANN, W.A. WOLSTENHOLME, *J.Chem.Soc. C* 3791 (1971)
- 270) D.G. ROUX, *Phytochem.* 11, 1219 (1972)
- 271) E. HASLAM, D. JACQUES, *Chem.Comm.* 231 (1974)
- 272) M. JAY, B. BOIRIN, J. FAVRE-BOVIN, J.F. GONNET, *Phytochem.* 13, 1565 (1974)
- 273) C.D. HUFFORD, W.L. LASSWELL jr., *J.Org.Chem.* 41, 1297 (1976)
- 274) R.HÄNSEL, D. OHLENDORF, A. PELTER, *Z.Naturforsch.* 253, 989 (1970)
- 275) K.WEINGES, J. PERNER, H.D. MARX, *Chem.Ber.* 103, 2344 (1970)
- 276) J. KENYON, R.F. MASON, *J.Chem.Soc.* 4964 (1952)
- 277) A.C. JAIN, S.M. JAIN, J. SINGH, *Tetrahedron* 30, 2485 (1974)
- 278) S.C. BHRARA, R.N. GOEL, A.S. JAIN, T.R. SESHADRI, *Ind.J.Chem.* 2, 399 (1964)
- 279) P. DIESEL, *Dissertation* (1974)
- 280) *Praktikumsvorschriften des Instituts f.pharmazeut.Arzneimittel-lehre Univ.München*
- 281) T. KARTNIG, O. WEGSCHÄIDER, *J.Chromatogr.* 61, 375 (1971)
- 282) K.G. KREBS, D. HEUSSER, H. WIMMER in *Dünnschicht-Chromatographie*, Herausg. E. STAHL, Springer Verl. (1967)
- 283) A. GERECS, *Magyar.Chem. Folyoirat* 36, 121 (1930)
- 284) C.F.H. ALLEN, J.W. GATES jr., *Org.Syntheses Coll. Vol. III*, 140 (1955)
- 285) B.H. KOEPPEN, C.J.B. SMITH, D.G. ROUX, *Biochem.J.* 83, 507 (1962)
- 286) Th.J. DE BOER, H.J. BACKER, *Recueil Trav.chim.Pays-Bas* 73, 229 (1954)
- 287) T.J. MABRY, J. KAGAN, H. RÖSLER, in *Nuclear Magnetic Resonance Analyses of Flavonoids*, The University of Texas Publication Nr. 6418 (1964)
- 288) D.L. STALLING, C.W. GEHRKE, R.W. ZUMWALT, *Biochem.Biophys. Res.Comm.* 31, 616 (1968)

D A N K S A G U N G

An erster Stelle gebührt mein Dank Herrn Professor Dr. H. Wagner für die Motivation zu dieser Arbeit und deren stete Förderung.

Für experimentelle Mitarbeit danke ich Frau G. Bohm und Frau B. Höfler an diesem Institut sehr herzlich.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. V.M. Chari aus unserem Arbeitskreis für die Diskussion von CMR-Spektren.

Für die Aufnahme und Interpretation von Massen- und NMR-Spektren habe ich Herrn Priv.Do. Dr.W. Schäfer und Herrn Priv.Do. Dr. J. Sonnenbichler vom Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried zu danken.

Ich danke ferner Herrn Professor Dr. L. Farkas und Frau Dr. B. Vermes, sowie den Herren Dr. F. Kallay und Dr. G. Janzso, alle aus Budapest, für die Bereitstellung von Testsubstanzen und für Synthesearbeiten.

Herr Professor Dr. H. Hrazdina, Freiburg i.B. stellte freundlicherweise einige Anthocyanine zur Verfügung.

Ebenso danke ich Frau Professor Dr. J.F. Morton, Miami, für die Beschaffung der Droge und den Herren Dr. A. Levai und Dr. A. Liptak aus Debrecen für synthetische Glykoside.

Zu danken habe ich auch Herrn Professor Dr. E. Stahl, Saarbrücken, für thermofraktographische Untersuchungen und Herrn Professor Dr. G. Snatzke, Bochum, für CD-Messungen.

Für die Erstellung des Manuskripts bin ich Frau Ch. Hofmann und Frau I. Andrae an diesem Institut und nicht zuletzt meiner Frau zu besonderem Dank verpflichtet.

Persönliche Daten

Otto S e l i g m a n n , geb. am 28.5.1930 in Köln/Rh.
verh., 4 Kinder

Eltern: Otto Seligmann, Grafiker und Genoveva
geb. Fischer

- | | |
|-------------|--|
| 1936 - 1941 | Besuch der Volksschule in Ingolstadt |
| 1941 - 1950 | Besuch der Oberrealschule Ingolstadt, Abitur |
| 1951 - 1959 | Studium der Naturwissenschaften und Chemie an
den Universitäten Zürich, Innsbruck und München,
Dipl.Vorexamen |
| 1956 - 1962 | Berufstätig als Angestellter der Bundesvermögens-
verwaltung, München |
| 1962 - 1964 | Ausbildung zum staatl.gepr. Chemotechniker an
der Fachschule Dr. Elhardt, München |
| 1964 - 1972 | Berufstätig als Techn.Assistent am Institut für
Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität
München |
| 1969 - 1972 | Studium der Pharmazie an der Universität München,
Staatsexamen |
| 1966 - 1977 | Leiter der mikroanalytischen und spektroskopischen
Abteilung des Instituts für Pharmazeutische Arznei-
mittellehre der Universität München |
| 1972 - 1977 | Verwalter der Dienstgeschäfte eines wissenschaft-
lichen Assistenten am gleichen Institut,
Promotionsarbeit unter Leitung von Professor
Dr. H. Wagner |

